

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



50

Diagnóstico microbiológico de las hepatitis víricas

Editores

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinador

Roberto Alonso Fernández

Autores

Antonio Aguilera Guirao
Roberto Alonso Fernández
Juan Córdoba Cortijo
Antonio Fuertes Ortiz de Urbina



ISBN: 978-84-617-1116-1

EDITORES:

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Aguilera Guirao A, Alonso Fernández R, Córdoba Cortijo J, Fuertes Ortiz de Urbina A. Diagnóstico microbiológico de las hepatitis víricas. 50. Alonso Fernández R (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014.

AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web www.seimc.org”

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emília Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

50. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS HEPATITIS VÍRICAS. 2014

Coordinador:

Roberto Alonso Fernández¹

Autores:

Antonio Aguilera Guirao²
Roberto Alonso Fernández¹
Juan Córdoba Cortijo³
Antonio Fuertes Ortiz de Urbina⁴



¹Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

²Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. ³Servicio de Microbiología, Hospital Universitari i Politènic La Fe de Valencia. ⁴LABCO QualityDiagnostics, Madrid.

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1.	Introducción general.....	7
2.	Hepatitis A.....	7
2.1.	Introducción	7
2.2.	Clínica	7
2.3.	Diagnóstico	7
2.3.1.	Marcadores serológicos	8
2.3.1.1.	IgM anti-VHA.....	8
2.3.1.2.	IgG anti-VHA	8
2.3.2.	Marcadores moleculares.....	9
2.3.2.1.	ARN del VHA.....	9
2.3.2.2.	Genotipo viral.	9
2.3.3.	Técnicas rápidas y otras.....	9
2.4.	Tratamiento.....	9
2.5.	Profilaxis	9
2.5.1.	Vacunación.....	9
2.5.2.	Gammaglobulinas inespecíficas.....	10
3.	Hepatitis B.....	10
3.1.	Introducción	10
3.2.	Consideraciones clínicas sobre el VHB	10
3.3.	Diagnóstico clínico del VHB	11
3.4.	Diagnóstico microbiológico.....	11
3.4.1.	Marcadores serológicos	11
3.4.1.1.	Antígeno de superficie: HBsAg	11
3.4.1.2.	Prueba confirmatoria para HBsAg	12
3.4.1.3.	Anticuerpos anti-HBs	12
3.4.1.4.	Anticuerpos anti-HBc: clase IgM e IgG	13
3.4.1.5.	Antígeno de la cápside: HBcAg (antígeno de la nucleocápside o antígeno del “core”).	14
3.4.1.6.	Sistema “e”: HBeAg y anti-HBe	14
3.4.1.7.	Pruebas rápidas	15
3.4.1.8.	Interpretación de los marcadores serológicos.....	15
3.4.1.8.1.	Estado de susceptibilidad o protección	15
3.4.1.8.2.	Diagnóstico en pacientes con cuadros agudos	16
3.4.1.8.3.	Diagnóstico en pacientes con cuadros crónicos.....	16
3.4.1.8.4.	Infección oculta por el VHB	17
3.4.2.	Marcadores moleculares.....	18
3.4.2.1.	Carga viral del VHB	18
3.4.2.2.	ADNccc intrahepático.....	19
3.4.2.3.	Genotipo viral	20
3.4.2.4.	Caracterización de variantes genómicas.....	20
3.4.2.4.1.	Variantes en el gen S.....	20
3.4.2.4.2.	Variantes en PC y PBC.....	20
3.4.2.4.3.	Variantes en el gen POL.....	21
3.5.	Tratamiento.....	22
3.6.	Profilaxis	23

4.	Hepatitis C	23
4.1.	Introducción	23
4.2.	Clínica	24
4.3.	Diagnóstico	24
4.3.1.	Marcadores serológicos	25
4.3.1.1.	Detección de anticuerpos anti-HCV	25
4.3.1.2.	Detección de antígenos del VHC	26
4.3.2.	Pruebas moleculares	26
4.3.2.1.	Carga viral del VHC	26
4.3.2.2.	Genotipado del VHC.....	27
4.4.	Tratamiento de la hepatitis crónica C	27
4.5.	Profilaxis	29
5.	Hepatitis delta	29
5.1.	Introducción	29
5.2.	Clínica	30
5.3.	Diagnóstico	30
5.3.1.	Marcadores serológicos	30
5.3.1.1.	Detección de HDAg en suero	30
5.3.1.2.	Detección de anticuerpos anti-VHD	30
5.3.2.	Marcadores moleculares.....	31
5.3.2.1.	ARN del VHD.....	31
5.3.2.2.	Genotipos del VHD.....	31
5.3.3.	Marcadores tisulares de la infección	31
5.4.	Tratamiento.....	32
5.5.	Profilaxis	32
6.	Hepatitis E	33
6.1.	Introducción	33
6.2.	Manifestaciones clínicas y diagnóstico clínico	33
6.3.	Diagnóstico microbiológico	33
6.3.1.	Marcadores serológicos	33
6.3.1.1.	IgM anti-VHE	34
6.3.1.2.	IgG anti-VHE	34
6.3.2.	Marcadores moleculares.....	34
6.3.2.1.	ARN del VHE	34
6.3.2.2.	Genotipo viral	35
6.3.3.	Técnicas rápidas y otras.....	35
6.4.	Tratamiento.....	35
6.5.	Profilaxis	36
7.	Hepatitis G y otros virus	36
7.1.	Virus TT (VTT) y otros anellovirus.....	36
7.2.	Virus de la hepatitis G (VHG o VGB-C).....	37
8.	Bibliografía	37

DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-HV-01. Marcadores serológicos de las hepatitis B y C
2. PNT-HV-02. Marcadores moleculares de las hepatitis B y C

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La inflamación hepática o *hepatitis* tiene causas diversas tanto infecciosas como no infecciosas. Entre estas últimas, se encuentran el alcoholismo, el consumo de drogas, la intoxicación química o por fármacos y las enfermedades autoinmunes. Entre las primeras, cabe destacar la etiología viral que es la causa de, al menos, la mitad de todas las hepatitis mundiales.

Se han descrito distintos virus con tropismo primario por el tejido hepático. Estos microorganismos se han ido nombrando sucesivamente con las letras del abecedario: *A, B, C, D, E* y *G*. El objetivo de este documento es revisar este grupo heterogéneo de virus en sus aspectos más básicos, sus implicaciones clínicas, su diagnóstico, su tratamiento y sus principales medidas profilácticas.

Existen otros virus causantes de hepatitis como el Citomegalovirus, el virus de Epstein Barr, virus del herpes simple, virus de la fiebre amarilla y el Parvovirus B19. Estos virus, sin embargo, no afectan al hígado de manera exclusiva y específica, sino que pueden afectar también a otros órganos o sistemas, por lo que no serán incluidos en este procedimiento.

2. HEPATITIS A

2.1 INTRODUCCIÓN

La hepatitis A está causada por un virus ARN de la familia *Picornaviridae* y género *Hepatovirus*. Tiene morfología icosaédrica sin envuelta, de unos 28 nm de diámetro y un solo genoma de ARN lineal de polaridad positiva con longitud total de 7,5 kb, que se traduce en una única poliproteína que, por sí sola, puede causar infección. La cápside está formada por cuatro proteínas estructurales (VP1-VP4). Aunque solo se ha identificado un serotipo, existen diferencias genómicas entre los aislados del virus de la hepatitis A (VHA) de diferentes partes del mundo, que permiten su clasificación en 6 genotipos diferentes (I a VI). Este virus es muy resistente a altas temperaturas, ácidos y álcalis.

El virus se elimina en grandes cantidades en las heces de los individuos infectados y se transmite por contacto directo oro-fecal y por ingestión de agua o alimentos contaminados. La prevalencia de la enfermedad está en relación directa con el grado de desarrollo socio-

económico y sanitario del entorno. En el mundo, las infecciones por VHA ascienden aproximadamente a 1,4 millones de casos al año. Se estima que más del 50% de la población mayor de 40 años posee anticuerpos de tipo IgG contra el virus. Se pueden considerar como factores de riesgo para la adquisición de la infección, convivir con pacientes infectados, especialmente si se mantienen relaciones sexuales, pertenecer a colectividades (cuarteles, guarderías etc.), hacer viajes a zonas endémicas, o vivir en zonas de epidemias de origen hidro-alimentario, aunque en un 50% no se identifica ninguna de estas circunstancias. Aunque el VHA es un virus hepatotropo, no siempre produce hepatitis aguda, sintomática o icterica.

2.2 CLÍNICA

El periodo de incubación es de 15-50 días, con una fase inicial pre-ictérica de pocos días a dos semanas. La infección tiene una fase de replicación en el hepatocito y otra fase inmunocitopática causando alteración en la arquitectura del lobulillo hepático y proliferación del mesénquima y de los conductos biliares, por destrucción de los hepatocitos por los linfocitos T citotóxicos. Ocasionalmente la inflamación lobulillar causa necrosis. La afectación es, principalmente, centrolobulillar. Cursa como un cuadro de aparición brusca, pseudo-gripal, con fiebre, astenia, mialgias o artralgias, anorexia, náuseas y vómitos, también, con estreñimiento o diarrea, dolor en el hipocondrio derecho, a veces con prurito e ictericia, que dura entre 1-2 semanas. En la exploración pueden detectarse adenopatías y exantema. Un 70% de los niños y un 30% de los adultos no tienen síntomas. Normalmente evoluciona en forma de hepatitis aguda no complicada, con desaparición de los síntomas y signos y vuelta a la normalidad completa, sin infección crónica. Tras la infección, el sistema inmune produce anticuerpos contra el virus que confieren inmunidad al sujeto contra futuras infecciones. Un 20% de los adultos requieren hospitalización, y sólo el uno por mil de los casos puede derivar en hepatitis fulminante con evolución hacia insuficiencia hepatocelular grave, generalmente asociados estos casos a otra patología de base.

2.3 DIAGNÓSTICO

Frecuentemente, la hepatitis A no puede distinguirse de las otras hepatitis virales por las características clínicas o epidemiológicas, ya que independientemente del correspondiente virus hepatotropo que la origina, las distintas hepatitis virales son muy similares en cuanto a síntomas clínicos, signos, anormalidades

bioquímicas y características histológicas. Por ello, su manejo está basado en la correcta utilización e interpretación de los diferentes marcadores virológicos específicos obtenidos en el laboratorio de microbiología.

Los signos y síntomas clínicos, vienen acompañados de alteraciones bioquímicas como el aumento de las enzimas de citolisis y colestasis (ALT, AST, GGT, bilirrubina, fosfatasa alcalina, coagulación). El diagnóstico de certeza consiste en la detección de la presencia de anticuerpos específicos de clase IgM o del genoma viral. Los anticuerpos anti-VHA de clase IgG persisten como marcador de inmunidad durante años. El aislamiento del virus en las heces tiene baja sensibilidad ya que la mayor eliminación del virus con ellas se produce durante el periodo de incubación (2 semanas antes del periodo sintomático). La detección directa del VHA por técnicas moleculares tiene una utilidad limitada en la práctica clínica, empleándose mayoritariamente en estudios epidemiológicos de brotes epidémicos para detectar el origen de las contaminaciones. También se ha utilizado la detección antigénica con estos fines.

Los marcadores virológicos (serológicos y moleculares) del VHA son herramientas utilizadas en el manejo de la hepatitis A, son la base para el su diagnóstico y permiten a su vez la caracterización de la historia natural de la infección en sus distintas fases.

En líneas generales las funciones del laboratorio de microbiología en el manejo de la hepatitis A se corresponden con la orientación del diagnóstico, con la constatación de la remisión de la infección cuando ésta se produce y también con la investigación epidemiológica e inmunitaria si es que se requiere.

2.3.1. Marcadores serológicos

El diagnóstico de la hepatitis A se fundamenta en la detección de anticuerpos específicos de clase IgM e IgG frente a antígenos virales (proteínas de la cápsida) del VHA en muestras de suero o plasma del paciente (Figura 1). Estos anticuerpos constituyen los principales marcadores serológicos de la infección y establecen el diagnóstico virológico de la misma.

2.3.1.1. IgM anti-VHA

En general el diagnóstico de la infección aguda por el VHA se establece por la presencia de anticuerpos específicos frente al virus de tipo IgM (IgM anti-VHA), que son los primeros en aparecer y se detectan durante un periodo de tiempo prolongado (de 3 a 6 meses); además su presencia coincide con la fase sintomática, cuando ésta se manifiesta. Virtualmente, todos los

pacientes con hepatitis aguda A tienen anticuerpos IgM anti-VHA en niveles detectables. Estos anticuerpos pueden ser detectados desde los 5-10 días antes de la aparición de los síntomas hasta los 6 meses del momento de la infección, cuando comienzan su declive hasta su desaparición. No obstante, en algunos pacientes se han detectado estos anticuerpos de clase IgM durante periodos más prolongados, incluso superiores a un año desde la infección y en algunos casos esta situación se asocia a la probabilidad de resultados falsos positivos, en personas sin evidencia de infección reciente.

Los sistemas comerciales más utilizados en nuestro medio para la detección de anticuerpos de clase IgM anti-VHA están comercializados por Abbott (ARCHITECT HAVAB-IGM), Siemens (anti-HAV IgM en microplaca para BEP III y BEP 2000 Advance y CLIA para Advia Centaur XP), Roche (Elecsys® Anti-HAV IgM), BioMerieux (Vidas HAV IgM), DiaSorin (ETI-HA-IGMK PLUS, en microplaca y Liaison® HAV IgM en CLIA), Ortho (Vitros ECi Anti-HAV IgM) y BioRad (Monolisa™ HAV IgM plus, microplaca).

2.3.1.2. IgG anti-VHA

Por lo que respecta a los anticuerpos específicos de clase IgG (IgG anti-VHA), aparecen posteriormente, durante la fase de convalecencia, coinciden durante un tiempo con los de clase IgM y persisten indefinidamente confiriendo inmunidad permanente que protege de la enfermedad. Estos anticuerpos no distinguen entre infección actual o pasada y además, también aparecen después de la inmunización pudiendo cuantificarse, por lo que su finalidad se circunscribe a estudios epidemiológicos de prevalencia o de investigación inmunitaria. Los sistemas más utilizados son equivalentes a los empleados para la detección de la IgM.

Los ensayos diseñados comercialmente para el diagnóstico serológico de la hepatitis A, detectan anticuerpos IgM anti-VHA, IgG anti-VHA y anticuerpos totales (IgG+IgM) anti-VHA en muestras de plasma o suero. Aunque no se utilizan en nuestro medio, existen métodos adaptados para la detección de anticuerpos específicos frente al VHA de tipo IgM, IgG e IgA en muestras de saliva y de tipo IgM e IgG en orina, aunque muestran una menor sensibilidad que en suero. La tecnología utilizada en el laboratorio de microbiología dependerá en cada caso de la finalidad y de las necesidades reales, desde sistemas sencillos muy manuales para pequeños laboratorios, a complejos sistemas automatizados para los laboratorios con cargas de trabajo mayores.

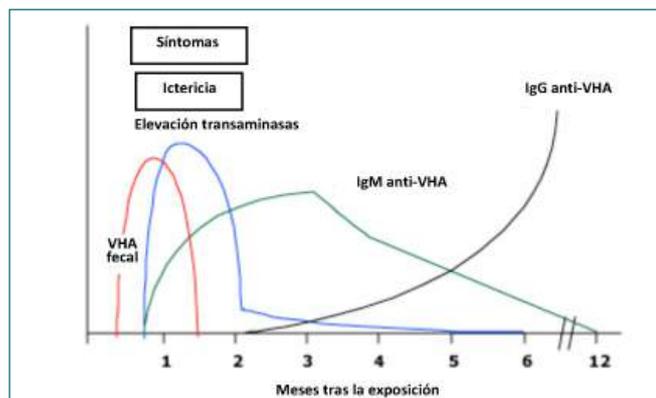


Figura 1. Marcadores analíticos de la Hepatitis A (Adaptado de MaCallum FO, Lancet 1947; 2:691)

2.3.2. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares del VHA se basan en la detección del ARN viral y permiten la detección directa del virus o su caracterización a través del genotipo viral.

2.3.2.1. ARN del VHA

La detección directa molecular del ARN viral no suele usarse habitualmente con fines diagnósticos en la práctica asistencial. Es posible utilizarla durante la fase aguda de la infección a partir de muestras de heces o suero utilizando métodos de amplificación de ácidos nucleicos, principalmente en laboratorios de referencia o investigación.

La tecnología utilizada para la amplificación y detección del ARN-VHA se fundamenta en la reacción de transcripción inversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en cualquiera de sus variantes (a tiempo final o a tiempo real). En la actualidad ya se encuentran comercializados ensayos de amplificación a tiempo real para detectar el ARN del VHA (por ejemplo, RealStar HAV RT-PCR kit 1.0, Altona Diagnostics) con excelente sensibilidad y especificidad en diferentes tipos de muestras. Estos métodos también han sido aplicados a la detección del virus en alimentos y muestras ambientales. Recientemente también se han desarrollado ensayos de PCR a tiempo real múltiples para la detección cualitativa y cuantitativa del ARN del VHA simultánea a ácidos nucleicos de otros virus hepatotropos en muestras de suero, con finalidad diagnóstica. Estos sistemas de diagnóstico sindrómico presentan además una gran sensibilidad durante el periodo de ventana.

2.3.2.2. Genotipo viral

En base a su diversidad genética en la región VP1 del genoma viral, el VHA se clasifica en seis genotipos (I al

VI). Sólo tres de ellos el I, II y III y sus correspondientes subtipos A y B, son capaces de infectar al hombre.

La caracterización molecular, en laboratorios de investigación, de las secuencias amplificadas por RT-PCR del ARN genómico mediante secuenciación y posterior análisis filogenético permite determinar los diferentes genotipos virales, que son de gran utilidad en los estudios de epidemiología molecular para caracterizar los brotes epidémicos.

2.3.3. Técnicas rápidas y otras

Existen pruebas rápidas para detectar anticuerpos específicos de clase IgM frente al VHA en muestras de suero o plasma, basadas en la inmunoadherencia por inmunocromatografía de flujo lateral.

La detección de antígenos de VHA en heces puede tener cierto interés diagnóstico. En este sentido, existe algún sistema comercializado en formato de inmunocromatografía que aporta resultados en pocos minutos (por ejemplo, CerTest HAV, CerTest Biotech ES).

La detección directa por inmunomicroscopía electrónica de los viriones en las heces de los pacientes es otra posibilidad poco práctica y reservada a laboratorios de investigación para determinar directamente la presencia viral. Del mismo modo la detección directa del antígeno viral en diferentes muestras clínicas por radioinmunoensayo o enzimoimmunoensayo tiene poca aplicación y se reserva a los mismos escenarios.

2.4. TRATAMIENTO

No existe un tratamiento antiviral específico para la hepatitis aguda por el VHA. En algunas situaciones son necesarias medidas generales de soporte, como tratamiento sintomático, hasta la resolución de la fase sintomática.

2.5. PROFILAXIS

Las medidas generales de higiene personal (por ejemplo, frecuentes y correctos lavados de manos) y ambiental (como la correcta conducción y tratamiento de aguas y conservación, lavado y cocinado de alimentos), son fundamentales para prevenir la adquisición de la infección.

2.5.1. Vacunación

La vacunación está indicada en personas susceptibles que pertenecen a grupos de riesgo. En algunos entornos se realiza también la vacunación universal entre

adolescentes con la vacuna combinada A+B frente a los virus de la hepatitis A y B.

Las vacunas comercializadas en nuestro país contienen virus inactivados con formol, desarrollados en cultivos celulares *in vitro*, y adsorbidos a partículas de hidróxido de aluminio como adyuvante para aumentar su inmunogenicidad. Se administran por vía intramuscular en dos dosis separadas de 6 a 12 meses e inducen una protección superior al 95%. La protección inducida por la vacuna es muy prolongada y no se considera necesaria la dosis de recuerdo (refuerzo).

2.5.2. Gammaglobulinas inespecíficas

Las inmunoglobulinas anti-VHA están indicadas en niños y adultos que no han recibido ninguna dosis de vacuna y conviven con pacientes infectados. Pueden administrarse simultáneamente a la vacuna pero en zonas separadas. Durante mucho tiempo ha constituido la medida habitual de prevención de la hepatitis A, pero actualmente casi ha sido sustituida por la vacuna por su mayor eficacia y duración de la protección.

3. HEPATITIS B

3.1. INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis B (VHB) fue descrito por Blumberg (bioquímico y fisiólogo americano, Premio Nobel de Medicina) en 1963. Pertenece a la familia *Hepadnaviridae*, tiene aproximadamente 42 nm de diámetro y cuenta con una nucleocápside de morfología icosaédrica y una envuelta lipídica. La cápside, contiene el genoma que consiste en una molécula circular de ADN circular bicatenario de 3,2 kb, cuya cadena positiva está parcialmente incompleta en su extremo 3'. El resultado es un ADN no cerrado covalentemente. Este pequeño genoma contiene siete señales de iniciación de la transcripción que definen genes parcialmente solapantes, con una capacidad de codificar proteínas muy superior a la que cabría esperar de su tamaño. Atendiendo a su organización se distinguen 4 genes: el gen *C* que codifica para la proteína del core o HBcAg y la proteína pre-core que por proteólisis genera el HBeAg; el gen *P* que codifica para la ADN polimerasa viral; el gen *S* que cuenta con tres señales de iniciación de la transcripción que definen las regiones preS1, preS2 y S que codifica para el HBsAg y el gen *X* que codifica una proteína no estructural (HBxAg) que es un potente transactivador de la transcripción, capaz de potenciar también la expresión de genes celulares y

quizás implicado en la cronificación de la enfermedad y en la evolución a carcinoma hepatocelular (CHC).

3.2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS SOBRE EL VHB

El panorama general de la infección por el virus de la hepatitis B no es muy diferente al de hace 10 años, estimándose hoy que existen unos 240 millones de personas portadoras de esta infección, que se perpetúa en la población con la aparición de 2-3 millones de casos nuevos cada año, y es una de las principales causas de hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular cuyas secuelas son responsables de la muerte de unas 600.000 personas cada año. Cuando la infección ocurre en un escenario de inmunotolerancia del paciente (recién nacidos y niños) la tasa de evolución a la cronicidad es muy alta (cerca del 90% en la infección perinatal y 30% en la infancia), mientras que en la infección en jóvenes y adultos es más frecuente la forma icterica que refleja una fuerte respuesta inmune. La curación clínica va a depender finalmente del resultado de la interacción entre la respuesta inmune y la actividad replicativa viral. Cuando los mecanismos inmunomoduladores son eficaces y cuantitativamente adecuados, cosa que sucede en la mayor parte de los individuos que se infectan, la primoinfección se resuelve de forma definitiva y sin apenas síntomas específicos; en pocas ocasiones (5-10%) la inmunomodulación excesiva provoca una respuesta inflamatoria severa en el hígado provocando síntomas de enfermedad aguda y alteraciones analíticas manifiestas y típicas y que, en la mayoría de casos, también se resuelven de forma favorable sin necesidad de ayuda terapéutica; de forma excepcional (<1%) existen pacientes con una reacción inflamatoria de tal magnitud y severidad que en unas pocas horas provoca una lisis rápida y masiva de hepatocitos infectados apareciendo un fracaso fulminante de las funciones hepáticas. Por último, en otros pacientes (5-10%), los sistemas defensivos no son lo suficientemente eficaces para controlar la replicación y la infección se cronifica, necesitando para su control la ayuda terapéutica. En zonas geográficas endémicas se ha comprobado una estrecha relación entre la forma crónica de la infección con la cirrosis y el hepatocarcinoma.

Por otra parte, la mejoría clínica y el control de esta infección no está inequívocamente asociada con la desaparición del virus. La persistencia de pequeños reservorios de ADNccc en el núcleo del hepatocito puede ser suficiente para que la enfermedad se mantenga de forma silente, asintomática y sin marcadores

de replicación detectables, pero lista para reactivarse si concurren ciertas situaciones clínicas, como la inmunodepresión.

3.3. DIAGNÓSTICO CLÍNICO DEL VHB

Mientras que el malestar, astenia, fatiga, fiebre, dolores musculares y articulares, náuseas, vómitos, orinas colúricas e ictericia acompañados de alteraciones importantes del perfil bioquímico hepático son los síntomas más frecuentes y relevantes del cuadro agudo sintomático, en la forma crónica, los síntomas son leves e intermitentes variando entre pequeñas dispepsias e intolerancias alimenticias concretas a cuadros de cansancio y astenia más o menos prolongados. El perfil bioquímico presenta alteraciones moderadas de las transaminasas que hacen sospechar la presencia de la infección viral. Existen infecciones que, por producir síntomas muy atípicos y poco relevantes, no son diagnosticadas como tales, la mayoría de ellas evolucionan de forma espontánea a la curación dejando protección permanente, otras cronifican y evolucionan con síntomas poco específicos y elevaciones moderadas y oscilantes de las transaminasas, cuya objetivación casual nos orientará a su diagnóstico.

La forma fulminante cursa con fallo multisistémico, por anulación de la función hepática con una rápida caída de los factores de coagulación y alteraciones bioquímicas muy llamativas.

La coinfección con otros virus puede dar lugar a modificaciones de los síntomas y del perfil bioquímico y esto es especialmente cierto con el VHD cuya infección en estos enfermos supone un factor de riesgo añadido en su evolución.

3.4. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

En el laboratorio se deben considerar dos grupos de pruebas: A) los marcadores serológicos clásicos y B) las pruebas moleculares para la detección del ácido nucleico (NAT).

En la última década las mejoras realizadas en los marcadores serológicos han supuesto la posibilidad de cuantificar el antígeno de superficie (HbsAg), el aumento de las sensibilidades y especificidades de las técnicas y su automatización. En el campo de las pruebas moleculares utilizadas para la detección y cuantificación del ADN viral los avances han sido aun mayores y han permitido su realización estandarizada en muchos laboratorios donde hace pocos años esto

era impensable. Este nuevo entorno en el laboratorio es un punto fundamental en la monitorización de los tratamientos y ha hecho posible un mejor diagnóstico, un mayor conocimiento de la biología del virus y, por tanto, de la patogenia de la enfermedad.

Podría decirse de un modo simplista que el anti-HBc IgM marca momentos recientes de la infección o reactivaciones, el anti-HBc IgG es marcador de contacto con el virus, el HBsAg es el marcador de la actividad de la enfermedad y de infectividad y se aclara con la elevación de su anticuerpo específico, el anti-HBs; este último anticuerpo es el único que confiere inmunidad frente al virus y puede surgir por la infección o por la vacunación; el HBeAg sería marcador de alta actividad replicativa viral, y se aclararía por elevación de su anticuerpo específico, el anti-HBe, o dejaría de detectarse por la aparición de variantes del virus con mutaciones en la región precore/core.

Los marcadores que se pueden observar en cada momento en el suero del paciente son consecuencia de la actividad replicativa viral en el hepatocito y de sus consecuencias inmunológicas. La interpretación correcta de estos marcadores en conjunto, de la presencia en el suero del virión, de alguna de sus proteínas, de los anticuerpos a los que dieron lugar o del ADN viral, permite establecer una correlación muy precisa de la historia natural de la enfermedad. En todos los casos la secuencia de aparición de los marcadores es la siguiente: ADN-VHB, HBsAg, anti-HBc (IgM e IgG), HBeAg, anti-HBe y anti-HBs. Los relacionados con la replicación viral son: ADN-HBV y HBeAg y de forma indirecta anti-HBc IgM. El marcador de curación es el anti-HBs y los marcadores anti-HBc IgG y anti-HBe conviene interpretarlos dentro del contexto del paciente. Otros marcadores como la determinación en biopsia hepática del ADNccc en hepatocito y en suero de los antígenos pre-S 1 y 2 y sus correspondientes anticuerpos pueden ser de utilidad para establecer un pronóstico pero no existen pruebas comerciales estandarizadas ni experiencia de uso que justifiquen su empleo.

Es importante recordar que la enfermedad no es la presencia de marcadores en el suero sino la del virus en el hepatocito infectado.

3.4.1. Marcadores serológicos

En la actualidad están disponibles para el diagnóstico de la infección los siguientes marcadores.

3.4.1.1. Antígeno de superficie: HBsAg

El HBsAg, antígeno de superficie o antígeno Australia,

expresión de la ORF S del gen S, se sintetiza en el citoplasma del hepatocito por la traducción de varios ARNm de 2,1 a 2,4 Kb. Es una partícula formada por más de 100 copias de moléculas proteicas con una compleja estructura tridimensional. Este antígeno se encuentra en el citoplasma unido a las membranas del retículo endoplasmático desde donde, libre y en gran cantidad, se excreta al torrente sanguíneo con formas de agregados esféricos o filamentosos según sea la cantidad de proteína preS1 o preS2 que contengan. Estas formas excretadas de antígeno, aunque son marcadoras de infectividad, no son infecciosas al carecer de ADN y pueden superar en número hasta 10^6 a las del propio virión. Otra pequeña parte de proteína de superficie, con proporciones reguladas de fracciones preS1 y preS2, entra a formar parte de la estructura del virión (partícula de Dane) al ensamblarse con la nucleocápside antes o en el momento de la salida del hepatocito. En las fases agudas, la viremia también es muy alta pudiéndose alcanzar concentraciones de 10^6 a 10^9 viriones/mL. La concentración de este antígeno en la sangre puede oscilar entre 50 y 300 $\mu\text{g/mL}$ aunque en algunos casos el HBsAg puede alcanzar concentraciones de hasta 1 mg/mL.

El HBsAg es un marcador muy precoz, puede ser detectable en el periodo de incubación, y lo es en la fase aguda y estadio crónico. En caso de evolución favorable, desaparecerá a los 3 ó 6 meses de la enfermedad. Si durante el transcurso del primer mes la concentración se mantiene o no existe una disminución significativa de su título se debe pensar en una posible evolución a la cronicidad. Por ello la positividad de este marcador más allá del sexto mes de la enfermedad, define la situación clínica de hepatitis crónica.

Se han reconocido diferentes expresiones fenotípicas del HBsAg, con un determinante antigénico específico de grupo, denominado "a", que se encuentra en todos los virus y dos grupos de subdeterminantes alélicos tipo-específicos e incompatibles designados "d" o "y" y "w" o "r". Existen pues cuatro subtipos principales de proteína HBsAg: adw, adr, ayw, ayr. Igualmente se ha descrito la heterogeneidad del determinante antigénico w y otros serotipos adicionales con lo que se demuestra la complejidad antigénica del virus. Esta caracterización en subtipos de HBsAg fue realizada hace más de 30 años y constituye sin duda la más temprana demostración de la diversidad del VHB.

No todas las pruebas comerciales tienen la misma sensibilidad para todas las variantes con mutaciones de escape en el gen S. La calidad de una prueba para

la determinación de HBsAg viene dada, entre otros factores, por poder detectar al menos, 0,25 ng/mL de esta proteína ya sea en su conformación salvaje de epítomos o en la de variantes surgidas por mutación o seleccionadas por la vacuna. Esto supone la actualización constante de los anti-HBs, tanto monoclonales como policlonales, empleados en la realización de la prueba como moléculas de captura de los epítomos HBsAg existentes en los virus circulantes. Algunos resultados falsos negativos pueden ser debidos a esta causa.

Aunque los ensayos de detección del HBsAg más utilizados son los cuantitativos, en la actualidad existen ensayos que demuestran la utilidad de la cuantificación del HbsAg. Numerosos estudios de cuantificación del HBsAg realizados estos últimos años y relacionados con la historia natural, patofisiología y respuesta al tratamiento de la hepatitis crónica B han demostrado básicamente la utilidad de la cuantificación de los niveles del HbsAg, que se fundamenta en su relación con la respuesta inmune, con los niveles del ADNccc y con la carga viral del VHB. Así, la determinación cuantitativa del HBsAg puede ser útil en la predicción de la respuesta al tratamiento con interferón, en la monitorización de la progresión de la enfermedad y en la identificación de los verdaderos portadores inactivos de la infección.

3.4.1.2. Prueba confirmatoria para HBsAg

Las pruebas serológicas comerciales detectan sólo algunos epítomos que están sobre la proteína S y ninguno de los correspondientes a pre-S2 y pre-S1. Por lo general producen lecturas altas y rara vez generan resultados positivos falsos. Cuando esto sucede casi siempre lo es con índices bajos. Estos resultados pueden confirmarse mediante técnicas de neutralización (se consideran positivas las inhibiciones superiores al 50%) o mediante otra prueba que utilice diferentes moléculas de captura. En muchas ocasiones, con las pruebas habituales, no es posible establecer la razón de esta reactividad que, en la mayoría de los casos, es inespecífica al no aparecer con el paso del tiempo otros marcadores serológicos (por ejemplo, HBeAg o anti-HBe) ni presencia de ADN en suero. Ante una prueba de neutralización positiva el paciente deberá ser monitorizado mediante serología y pruebas NAT y los resultados serán interpretados en el contexto clínico del paciente.

3.4.1.3. Anticuerpos anti-HBs

El HBsAg provoca la aparición de anticuerpos neutralizantes contra sus epítomos conformacionales. Los

anticuerpos están dirigidos frente a varios lugares antigénicos del HBsAg y todos ellos se denominan genéricamente anti-HBs. Algunos anticuerpos son únicos para determinadas cepas del virus, pero en todos los pacientes y personas vacunadas, el anticuerpo predominante es el anti-HBs/a dirigido frente al determinante común "a". No hay diferencia en la virulencia de las diferentes cepas de VHB pero cada una induce anticuerpos para su propio antígeno de subtipo. Estos anticuerpos también se detectan, con diferente sensibilidad, mediante las pruebas serológicas comerciales. Los anticuerpos subtipo específicos, probablemente solo producen protección contra la cepa a la que van dirigidas.

El anti-HBs es el último marcador en aparecer. Su seroconversión sucede poco después de la desaparición del HBsAg, a los 2 o tres meses de la infección en los cursos agudos autolimitados. La presencia de este marcador indica inmunidad de larga duración frente a la reinfección. En los vacunados es el único marcador de VHB presente y se considera que un individuo está protegido si la concentración de este anticuerpo supera las 10-20 mUI/mL.

En los individuos vacunados, la respuesta no es tan intensa como la que ocurre tras la infección y los anticuerpos inducidos mediante aquella declinan a mayor velocidad hasta su posible total desaparición. Un cierto número de respondedores, pasados unos años y en relación con el título alcanzado tras la vacunación, pueden colocarse por debajo del nivel detectable de anticuerpos. Estos pacientes permanecen protegidos frente a la reinfección, no obstante algunos autores consideran aconsejable revacunar a estos pacientes especialmente si pertenecen a colectivos con riesgo de infección. No se conoce con certeza cuál es el nivel mínimo de anticuerpos que protege de la infección pero se piensa que incluso los individuos vacunados no respondedores permanecen protegidos de la infección y que se mantendría una memoria inmunológica que elevaría títulos de anticuerpos ante cualquier estímulo antigénico.

En los pacientes que se han curado, los anticuerpos son detectables durante mucho tiempo. Se ha descrito excepcionalmente la presencia simultánea de HBsAg y anticuerpo anti-HBs. Las pruebas comerciales detectan principalmente los subtipos anti-ad y anti-ay. Se ha evidenciado también la presencia de inmunocomplejos circulantes HBsAg/anti-HBs que ha permitido postular que la aparición de anti-HBs puede ser muy precoz en el curso de la infección aunque su detección

en estas etapas iniciales quedaría dificultada. La existencia de estos grandes inmunocomplejos, también permite implicar al VHB en procesos de base inmunológica tales como la poliartritis nodosa, la glomerulonefritis membranosa en niños y la crioglobulinemia mixta esencial. Es muy posible sin embargo que en la patogenia de estas enfermedades intervengan también otros factores, puesto que dada la alta incidencia de formas crónicas de hepatitis B, cabría esperar una mayor presencia de estos procesos.

3.4.1.4. Anticuerpos anti-HBc: clase IgM e IgG

Los anti-HBc producidos inicialmente son predominantemente de clase IgM con escasa concentración de IgG e IgA. En la enfermedad autolimitada alcanzan su concentración más elevada coincidiendo con el momento de la máxima expresión clínica siendo, a partir de este momento, cuando su tasa comienza a disminuir de forma progresiva hasta hacerse indetectables en el plazo de unos 3 a 6 meses. Solo en el caso del establecimiento de la infección crónica es posible nuevamente, y de forma intermitente, su detección en concentraciones más bajas. En estos enfermos la reaparición del anti-HBc IgM permite clasificar la aparición de un cuadro agudo como de reactivación de la infección pudiendo decir que el anti-HBc IgM es un marcador de actividad inflamatoria de la infección.

El anti-HBc IgG es ya detectable con los síntomas iniciales de la infección y persiste en el suero durante toda la enfermedad y más allá de la curación clínica. Al contrario de lo que sucede con la IgM, la concentración de los anticuerpos de clase IgG continua en ascenso hasta la convalecencia y permanecen detectables de por vida. Su positividad indica contacto con el virus y aunque se encuentra a títulos muy elevados en las fases agudas y convalecientes, no es un anticuerpo protector. En caso de cronicación, los títulos están sujetos a variaciones moderadas debido probablemente al estímulo continuado del sistema inmune provocado por la producción intermitente de las proteínas virales.

En algunos pacientes es posible que el anti-HBc sea el único marcador visible. Esta situación puede deberse a diferentes causas: la primera y más frecuente es la curación de la enfermedad en la que, con el tiempo, se pueden haber perdido el resto de los marcadores; la segunda, una prolongada etapa de "seroconversión HBsAg/anti-HBs" en la que HBsAg es negativo por producirse en cantidades que la prueba diagnóstica no puede detectar o por estar conjugado con anti-HBs y tercera, pacientes infectados crónicos replicadores

que producen muy poco HBsAg. Hay que considerar además como posibilidad el falso positivo del anti-HBc. Los anticuerpos de la clase IgG al permanecer detectables durante varios años presentan gran utilidad en estudios epidemiológicos.

En síntesis podemos decir que el anti-HBc IgG siempre es detectable después de la infección pero su presencia no siempre indica infección activa.

3.4.1.5. Antígeno de la cápside: HBcAg (antígeno de la nucleocápside o antígeno del "core")

El "core" del VHB está formado por ácido nucleico, ADN polimerasa y una nucleoproteína antigénica. Se sintetiza en pocos hepatocitos del hígado infectado y se ensambla en el núcleo formando una nucleocápside de 27 nm de diámetro. Una vez ensamblado se recubre con el HBsAg en el citoplasma celular. Es extraordinariamente antigénico y solo es posible hallarlo en el suero del enfermo formando parte de la partícula de Dane o disgregándolo de su anticuerpo con el que puede formar inmunocomplejos circulantes. Las técnicas, todas experimentales, que pretenden la puesta en evidencia de este antígeno en la sangre, exigen el tratamiento previo de esta partícula para eliminar el HBsAg que lo oculta. En las hepatitis crónicas persistentes, se ha encontrado este antígeno casi exclusivamente en el núcleo del hepatocito, mientras que en las formas crónicas activas puede encontrarse también en el citoplasma de las células hepáticas.

3.4.1.6. Sistema "e": HBeAg y anti-HBe

El HBeAg es una proteína no estructural del VHB. Se origina por la traducción del mismo ARNm codificador del HBcAg previamente procesado y, por tanto, posee secuencias de aminoácidos que, esencialmente, son idénticas a las que forman la nucleocápside viral. El HBeAg es más pequeño que la proteína HBcAg y existe de forma monomérica, mientras que las proteínas HBcAg son parte de una partícula polimérica con epítomos conformacionales. Este cambio en la estructura espacial hace que, a pesar de su similitud lineal, sean antigénicamente diferentes. Se le supone un papel importantísimo en la inmunomodulación y la "tolerancia" viral.

El HBeAg es detectable en algunos pacientes HBsAg positivos, ya estén en la fase aguda o crónica de la enfermedad. El valor diagnóstico de la detección de este antígeno se fundamenta en la excelente correlación de su presencia con la existencia de una alta actividad replicadora del virus y concentraciones elevadas de viremia (entre 10^5 y 10^8 equivalentes genómi-

cos por mililitro de suero) por ello, la sangre de estos pacientes siempre se ha considerado como altamente infecciosa. La determinación de su presencia es obligatoria en todas las muestras HBsAg positivas. Es de señalar también la importancia de su determinación en las mujeres gestantes positivas para HBsAg, dada la relación existente entre su presencia y la transmisión perinatal de la enfermedad.

La evolución de su concentración es variable. Parece que altas concentraciones de HBeAg en las primeras semanas o su persistencia más allá de las 6-8 semanas de la infección podría indicar un curso crónico de la enfermedad. En los casos de buena evolución su reactividad disminuye con el tiempo haciéndose indetectable siempre antes de la desaparición del HBsAg. El aclaramiento del HBeAg en la evolución de una hepatitis aguda o crónica suele indicar un buen pronóstico y con cierta frecuencia el inicio de una fase de erradicación del virus.

Por otra parte, algunos pacientes con replicación activa (ADN detectable) y enfermedad hepática no producen o han dejado de producir HBeAg. Se sabe que esta situación se genera por la presencia de una mutación en la posición 1896 (G1896A) de la región pre-core del genoma viral. Esta mutación (pre-core "minus") convierte el codón salvaje en un codón de parada, por lo que en la síntesis de las proteínas virales, el precursor del HBeAg no se produce.

En este sentido, los títulos de HBeAg también pueden disminuir independientemente de la replicación viral, cuando las variantes con mutaciones en precore y promotor basal del core emergen previamente a la seroconversión del HBeAg, por estos motivos no se puede considerar al HBeAg estrictamente como un marcador de replicación viral, ya que su negatividad no se relaciona con la ausencia de replicación. Estos hechos demuestran el uso limitado que tendría la serología cuantitativa del HBeAg. Por último, si en el seno de una hepatitis crónica replicadora aparece el virus mutante y éste prolifera, la lesión hepática tiene peor pronóstico.

La aparición de anticuerpos anti-HBe en el curso de una infección aguda, indica generalmente un buen control de la infección y una disminución progresiva de la infectividad. La seroconversión temprana para este marcador indica, casi siempre, recuperación de la enfermedad pero habitualmente existe un pequeño retraso entre la desaparición del HBeAg y la detección del anti-HBe. En algunos pacientes con infección crónica

puede coexistir el anti-HBe con HBsAg, lo cual indica escasa actividad replicativa viral. En la mayoría de los casos crónicos la seroconversión a anti-HBe sucede pasados varios años (2-6% anual) y en estos casos, es necesaria la comprobación de la actividad replicadora para instaurar un seguimiento correcto.

Con la excepción del antígeno del core (HBcAg) que no está fácilmente disponible comercialmente, el resto de los marcadores serológicos del VHB están producidos y comercializados principalmente por Abbott (CLIA en Architect), Siemens (formato ELISA para BEP III y BEP 2000 Advance y formato CLIA para Advia Centaur XP), DiaSorin-Murex (ELISA, ETI- y CLIA, Liaison®), BioRad (formato ELISA, Monolisa™), Ortho (CLIA, Vitros ECi Immunodiagnostic System) BioMerieux (ELISA en formato monotest, VIDAS) y Roche (CLIA, Elecsys®).

3.4.1.7. Pruebas rápidas

Existen en el mercado multitud de pruebas “rápidas” (la mayoría de ellas basadas en ensayos de inmunoadherencia por inmunocromatografía) para la detección de HBsAg, que se caracterizan por realizarse con suero, plasma o sangre total en unos pocos minutos. La mayoría cuentan con una buena especificidad. En cuanto a la sensibilidad, ninguna alcanza la de los inmunoensayos enzimáticos, fluorescentes o quimioluminiscentes. Un problema de estos sistemas es que suelen carecer de la sensibilidad suficiente para la detección de las nuevas mutantes que van apareciendo.

3.4.1.8. Interpretación de los marcadores serológicos

La valoración de los resultados analíticos debe hacerse de manera global. Es obvio, por ejemplo, que el significado de un anti-HBc IgG será diferente según se acompañe de un HBsAg positivo o negativo. Es conveniente disponer de algoritmos que, racionalicen los procesos del laboratorio y comunicar adecuadamente los resultados en función de los conocimientos del entorno solicitante, proporcionando una somera interpretación del patrón de marcadores encontrado.

Desde el punto de vista de la interpretación de los resultados, las combinaciones de marcadores más frecuentes son las obtenidas en los casos de infección aguda (primoinfección), curación, infección crónica y vacunación (Figura 2 y Tabla 1). Hay combinaciones excepcionales, que están relacionadas con alteraciones de la reactividad provocada por acontecimientos clínicos intercurrentes en el paciente (inmunosupresión, trasplante, vacunaciones no debidas, transfusión

de derivados hemáticos, etc.), por mutaciones en el virus o por causa de las muestras.

La solicitud al laboratorio del estudio de marcadores del VHB, responde principalmente a 2 situaciones: el conocimiento del estado de susceptibilidad o protección de un individuo que, generalmente, está sano y el diagnóstico de una infección clínicamente compatible con una hepatitis B. Adicionalmente, los marcadores del VHB se solicitan en el seno de actividades preventivas como el estudio en la gestación, en los pacientes en programas de hemodiálisis profilaxis anti-VHB en pacientes inmunodeprimidos y el protocolo para donantes de sangre y de órganos. La monitorización del tratamiento sería otra de las posibles situaciones en las que puede requerirse la realización de determinados marcadores.

3.4.1.8.1. Estado de susceptibilidad o protección.

Se realiza mediante la determinación del anti-HBs. Si este marcador es positivo según los convenios internacionales y resultados estadísticos, es decir, mayor de 10mUI/mL, el paciente, se considerará protegido frente a la infección por el VHB. Los anticuerpos protectores pueden haberse adquirido mediante la vacunación o la infección viral. La inmunidad conseguida tras la vacunación es eficaz en casi la totalidad de los individuos estudiados y, aunque los niveles de anticuerpos obtenidos no son predecibles, son muy escasos los individuos clasificados como no respondedores después del cumplimiento del protocolo de vacunación y estos se relacionan, generalmente, con la pertenencia a determinados grupos de HLA y a pacientes en programas de hemodiálisis. La inmunidad producida por la primoinfección viral provoca en la mayoría de los individuos considerados sanos, una excepcional concentración de anticuerpos desde las fases tempranas de la enfermedad pero solo comienzan a ser detectables algo más tarde, cuando la producción de proteína de envoltura disminuye transcurridos 3 a 4 meses del cuadro agudo. Aunque la concentración de los anticuerpos, tanto los vacunales como los obtenidos mediante la infección, van disminuyendo con el tiempo, el individuo no deja de estar protegido, si bien es conveniente (en el caso de vacunación) continuar con la administración de las dosis de recuerdo que su programa de inmunización sugiera. La infección por algunos virus portadores de mutantes en el gen S puede hacer que la protección conferida por los anti-HBs vacunales no sea eficaz y conlleve a que, en un 2% de los niños, pueda producirse la infección. El análisis de estos casos demuestra la sustitución de un solo aminoácido en el HBsAg. En estos casos, el “mutante

de escape” no es neutralizado por los anti-HBs producidos por la vacunación.

La administración de inmunoglobulina hiperinmune para VHB supone el aporte de anti-HBs y por tanto la aparición de una seroconversión o serorrefuerzo. Lo mismo puede suceder con la administración de plasma, de concentrados de inmunoglobulinas o de derivados sanguíneos. La peculiaridad de estos preparados es que pueden proporcionar además otros marcadores como el anti-HBc IgG que también puede ser detectable.

Es digno de mención que los pacientes recientemente vacunados, pueden mostrar niveles detectables de HBsAg (vacunal) durante algunos días. Es especialmente frecuente que esto levante una alarma infundada en ciertas circunstancias, como puede ser la hemodiálisis. La antigenemia en estos casos es transitoria, no denota infección y se aclara en una o dos semanas.

La presencia de anticuerpos “protectores” para el VHB en el recién nacido, en la mayoría de los casos, responde a la transferencia desde la madre durante los meses de gestación y son por tanto transitorios (desaparecerán en el plazo de unas semanas). Solo excepcionalmente será reflejo de una infección intra-útero.

3.4.1.8.2. Diagnóstico en pacientes con cuadros agudos

El estudio serológico para el diagnóstico de la infección por el VHB debe comenzar con la realización del HBsAg y el anti-HBc (IgM e IgG). Después de conocer los resultados de estos marcadores de primer nivel, se valorará la realización de los restantes (HBeAg, anti-HBe y anti-HBs).

Dado que la opción anti-HBc (-) / HBsAg (+) es rara (periodo ventana), y que las determinaciones de anti-HBc actualmente son extremadamente sensibles, se ha llegado a considerar la posibilidad de un “screening” primario exclusivamente con anti-HBc, en el que su positividad desencadenaría la determinación del HBsAg. Este “screening” simplificado puede tener grandes limitaciones en ciertos contextos por lo que debería evitarse si se sospecha infección muy reciente, en muestras de pacientes severamente inmunodeprimidos, en estados de hipogammaglobulinemia o en situaciones donde, excluir un periodo ventana es de vital importancia (por ejemplo, donaciones de órganos o hemodiálisis).

La hepatitis viral aguda suele estar producida por primoinfección y se presenta con gran sintomatología. En los tiempos actuales en los que la inmunosupresión nos ha concedido muchos beneficios terapéuticos, las reactivaciones de algunas formas crónicas, ayudadas por tratamientos adyuvantes, pueden ser también responsables de estos cuadros.

En estos pacientes, se detectarán normalmente HBsAg y anticuerpos IgG e IgM frente al antígeno “core”. Muy frecuentemente, estos pacientes presentarán también, en el segundo nivel de diagnóstico, positividad para el HBeAg. Con el tiempo las seroconversiones a anti-HBe y anti-HBs nos harán sospechar el control y curación de la infección.

En pacientes inmunosuprimidos que desarrollan cuadros agudos, ya por primoinfección o por reactivación, es posible constatar la presencia de HBsAg con ausencia de anticuerpos frente al sistema “core”. En estos pacientes, incapaces de establecer una respuesta inmune detectable, es muy probable que en el segundo nivel de diagnóstico se produzca reactividad para el HBeAg lo que nos confirmará el diagnóstico descartando un resultado falso positivo del HBsAg. La evolución de la infección en estos pacientes dependerá mucho del tratamiento. Su seguimiento serológico podría ser complejo por su escaso poder de respuesta y por la administración de globulinas e inmunomoduladores si esto se produce.

3.4.1.8.3. Diagnóstico en pacientes con cuadros crónicos

La mayoría de las de hepatitis B agudas en el adulto aclaran el HBsAg del suero entre el tercer y cuarto mes desde la infección, pero en un 5-10%, la antigenemia puede persistir más de 6 meses y esto define la forma crónica de la enfermedad (Figura 2). Por el contrario el 90% de los niños infectados por vía perinatal llegan al estado de portador con casi nula oportunidad de curarse a lo largo de su vida. Lo mismo sucede con los pacientes que de alguna manera tienen comprometidos sus mecanismos naturales de respuesta como son los coinfectados con VIH, virus delta o en tratamiento con inmunosupresores.

Existen tres formas de enfermedad crónica: activa, inmunotolerante e inactiva, cada una de las cuales presenta unas características serológicas que deben interpretarse en “tándem” con la viremia y la bioquímica hepática (estos enfermos mantienen niveles anormales de transaminasas, aunque inferiores a los de las formas agudas).

En la forma *activa* el HBsAg se mantiene en concentraciones muy elevadas sin poder inducir la aparición de anti-HBs. El anti-HBc es de clase IgG aunque en algunos pacientes, en las fases de intensificación de la necrosis, pueden detectarse anticuerpos a títulos bajos de la clase IgM. Lo típico de esta forma activa es que después de la enfermedad aguda la IgM anti-HBc disminuya lentamente hasta negativizarse, pero los marcadores de replicación, HBeAg y ADN viral ($>10^5$ copias/mL), permanecen detectables a concentraciones elevadas. El aumento de las transaminasas indica la actividad de la enfermedad. Esta forma activa también es conocida como hepatitis crónica B HBeAg positiva.

En la forma *inmunotolerante*, término controvertido pero conceptualmente útil, los pacientes, a pesar de mantener una replicación viral intensa, HBeAg y ADN viral detectable, no son capaces de producir una respuesta inflamatoria acorde con su situación replicadora y se mantienen durante tiempo en esta situación manteniendo las transaminasas con escasas alteraciones que nos indican poca necrosis o inflamación hepática.

En ocasiones, cuando se consolida la forma crónica activa, el HBeAg tiende a desaparecer de forma espontánea o por acción del tratamiento ocurriendo la seroconversión a anti-HBe. La tasa anual de esta seroconversión es del 3 al 25% y cuando esto sucede el virus deja de replicarse con intensidad, ADN $< 10^5$ copias/mL, las transaminasas se normalizan y el enfermo entra en la *forma inactiva* o de “portadores asintomáticos verdaderos” con capacidad de reactivación de la enfermedad (forma replicadora con escasa lesión

histológica también conocida como hepatitis crónica B HBeAg negativa).

Es posible la alternancia de una a otra forma a lo largo del tiempo y dependiendo de las circunstancias del paciente.

En ciertos pacientes el aclaramiento del HBeAg o la seroconversión no supone una mejora en el pronóstico de la enfermedad sino la selección de un mutante precore “minus”. Así pues, la presencia de anti-HBe en un paciente crónico no excluye la posibilidad de presencia o selección de este tipo de mutantes. Si esto sucede se trata de un virus en fase replicadora con ADN del VHB detectable, incapaz de fabricar proteína HBe y con posible presencia, probablemente temporal, de anti-HBe producidos durante el periodo de infección dominado por el virus salvaje.

La reactivación de una forma crónica puede suceder de forma espontánea o al poco tiempo del inicio de un tratamiento con inmunosupresores o quimioterápicos. La frecuencia de esta forma es desconocida al igual que su mecanismo patogénico y el diagnóstico desde el laboratorio es difícil porque requiere el conocimiento previo del padecimiento de la enfermedad. Si la reactivación se controla, los enfermos suelen permanecer seropositivos para HBsAg y el anti-HBc IgM durante mucho tiempo.

3.4.1.8.4. Infección oculta por el VHB

En el año 2008, la EASL (*European Association for the Study of the Liver*) definió la infección oculta por el VHB (OBI) como la presencia de ADN del VHB en el hígado (con o sin ADN viral en suero) en individuos catego-

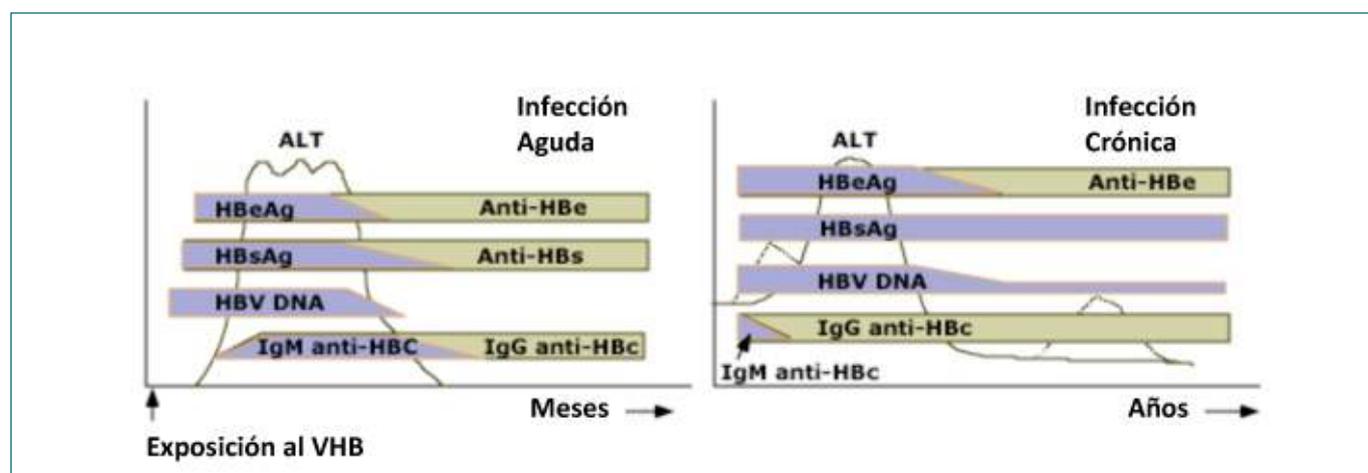


Figura 2. Marcadores analíticos de la Hepatitis B en su forma aguda (izda.) y crónica (dcha.). Adaptado de UpToDate (hepatitis B, gráfico 69344).

Tabla 1. Perfiles serológicos más frecuentes en relación con el VHB.

Situación del individuo o paciente	anti-HBc IgM	Anti-HBc IgG	HBsAg	Anti-HBs
Ausencia de infección y susceptibilidad	-	-	-	-
Infección pasada e inmunidad	-	+	-	+
Inmunidad vacunal	-	-	-	+
Infección aguda	+	+ / -	+	-
Infección crónica	-	+	+ ⁽¹⁾	-
“Core aislado” ⁽²⁾	-	+	-	-

⁽¹⁾ La infección crónica se define por la presencia del HBsAg más de 6 meses. ⁽²⁾ Este perfil puede presentarse por diversas causas: 1) infecciones resueltas antiguas en las que el resto de los anticuerpos se han aclarado; 2) infecciones (agudas o crónicas) que producen cantidades de HBsAg por debajo de la sensibilidad de la técnica de detección o mutantes no detectables; 3) falso positivo del ensayo.

rizados como negativos para el HBsAg. A pesar de ello, varios aspectos de la infección oculta por VHB son todavía desconocidos y necesitan ser aclarados en posteriores estudios, incluyendo la propia definición, los grupos de riesgo, el significado clínico (sobre todo si se tiene en cuenta que la detección de ADN-VHB no siempre indica infectividad), su infectividad y posible transmisión, sus consecuencias patogénicas (reactivación y progresión a enfermedad hepática crónica o carcinoma hepatocelular) y especialmente la aproximación estandarizada para la detección en el laboratorio.

3.4.2. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares del VHB son aquellos basados en la detección del ADN viral como la determinación de la carga viral, el genotipo, las caracterización de las diferentes variantes genómicas, y el ADNccc intrahepático.

3.4.2.1. Carga viral del VHB

En la historia natural de la hepatitis B crónica, la progresión de la enfermedad hepática se encuentra estrechamente relacionada con factores de origen viral y del huésped; de todos ellos, quizás el factor más importante sea sin duda el mantenimiento de una replicación viral activa en el paciente infectado. Por tanto, la utilización de marcadores moleculares, que como la carga viral son indicadores directos de la replicación viral y permiten su cuantificación, va a ser

primordial para el manejo de los pacientes infectados por el virus.

En este sentido, entre los años 2006 y 2007 el estudio de Evaluación de los Riesgos de la Elevación de la Carga Viral asociados a la enfermedad hepática/cáncer por VHB (REVEAL-HBV), encontró que la cuantificación de la carga viral era esencial para caracterizar el estado en que se encontraba la infección, así como para evaluar el riesgo de desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC) al existir una relación directa entre este riesgo y el nivel de carga viral en el momento del inicio del seguimiento (ingreso) o bien con el mantenimiento de niveles altos de replicación durante el mismo. Este estudio demostró, después de analizar las distintas variables estudiadas (transaminasas, variantes PC y PBC, etc.) que la carga viral era el mejor predictor de la progresión a cirrosis y CHC y que esta progresión además era proporcional a los niveles de carga viral.

Las principales aplicaciones de este marcador de replicación en la práctica clínica se fundamentan en la definición de la presencia de la infección (sea esta oculta o no), en la demostración y diferenciación de la condición de portador inactivo o asintomático mediante la estimación de la infectividad, en la toma de decisiones terapéuticas, en la monitorización de la respuesta al tratamiento de cara a la consecución de la respuesta virológica, en la predicción y en la detección

Tabla 2. Principales ensayos comerciales para la cuantificación del VHB.

FABRICANTE	ENSAYO	MÉTODO	LÍMITE DE DETECCIÓN (UI/ML)
Siemens Medical Solutions Diagnostics	VERSANT HBV DNA 1.0 Assay (kPCR)	PCR tiempo real	64
Roche Diagnostics	COBAS Ampliprep /COBAS TaqMan HBV v2.0	PCR tiempo real	20
Abbott Molecular	Abbott RealTime HBV	PCR tiempo real	10
QIAGEN Diagnostics	artus HBV QS-RGD Kit	PCR tiempo real	10

de la aparición de mutantes resistentes, y por último en la prevención del riesgo de recurrencias en los pacientes trasplantados.

Por tanto, el manejo de la infección crónica por el VHB se va a basar primordialmente y en la mayoría de los pacientes en la medida de la carga viral antes, durante y después del tratamiento. En consecuencia, la monitorización seriada de la carga viral es más importante que cualquier valor aislado de corte arbitrario especialmente en el pronóstico y en la decisión del tratamiento.

Por estos y otros motivos, son necesarios pruebas que sean sensibles, específicas, seguras, precisas, reproducibles, automatizables y con un amplio rango dinámico de cuantificación que permita la interpretación fiable de los datos de carga viral. En este sentido los ensayos de amplificación por PCR o TMA en tiempo real son los que mejor se ajustan hoy en día a estos requerimientos. La Tabla 2 recoge los principales sistemas disponibles en la actualidad para la detección de la carga viral del VHB. A lo largo del 2014 o durante el 2015 van a lanzarse al mercado nuevos sistemas como APTIMA HBV Quantitative Assay (Gen-Probe) basado en tecnología de TMA a tiempo real o VERIS MDx HBV (Beckman Coulter), HBV COBAS 6.800/8.800 (Roche) o Xpert HBV (Cepheid) con PCR a tiempo real. Estos últimos sistemas ofrecerán grandes ventajas como reactivos refrigerados listos para usar, carga continua o incluso formatos mono-test.

Conviene considerar que la utilización desde hace unos años de un estándar de la OMS para la normalización de la expresión de las concentraciones de ADN-VHB ha permitido eliminar la variabilidad existente en la in-

terpretación de los resultados obtenidos en el tiempo. Por otra parte, no todas pruebas de cuantificación producen resultados equivalentes. Los valores, para una muestra individual, obtenidos con los diferentes ensayos de cuantificación viral no pueden utilizarse de manera intercambiable, a pesar de su calibración con unidades internacionales. La implicación práctica que esto conlleva es que la monitorización puede estar erróneamente alterada si el método y el laboratorio utilizados se cambian durante la misma.

Y por último, los microbiólogos deberán estar informados sobre estas diferencias, aconsejando al clínico en la necesidad de ser prudentes al interpretar las recomendaciones de los algoritmos de monitorización del tratamiento cuando los resultados de las técnicas de cuantificación están próximos a los umbrales de decisión.

3.4.2.2. ADNccc intrahepático

Por lo que se refiere al ADNccc, hay que señalar que durante la infección por el VHB, éste se acumula en el núcleo celular de los hepatocitos, actuando como molde para la transcripción de los genes virales.

Considerando la larga vida media de los hepatocitos, el aclaramiento de los reservorios de ADNccc de las células infectadas parece ser precisamente el factor limitante de la eliminación del VHB, ya que éstos persisten a pesar de las reducciones experimentadas en los niveles séricos de ADN viral, como la provocada por el tratamiento, y parecen ser los responsables de la replicación viral tras cesar el mismo. Estos datos, indicarían el posible interés de la monitorización del ADNccc en tejido hepático. Un interés ciertamente limitado por

el requerimiento de biopsia hepática y la ausencia de métodos moleculares sensibles y específicos para su detección y cuantificación.

La buena correlación observada en algunos estudios con los niveles de HBsAg sugiere que la determinación cuantitativa de este antígeno, podría ser una alternativa práctica a la determinación del ADNccc en tejido hepático.

3.4.2.3. Genotipo viral

Uno de los aspectos esenciales del VHB es su gran variabilidad genética. Esta hipervariabilidad, especialmente en el gen S es la responsable de la diversidad genética que caracteriza al VHB en genotipos y subtipos. Hasta el momento, se han identificado 10 genotipos diferentes (A-J), que presentan un grado de divergencia genómica superior al 8% a nivel de nucleótidos en el genoma viral completo. En líneas generales, los genotipos A y D son los más prevalentes en Europa. Mientras que, los genotipos B y C lo son en Asia, el genotipo E lo es de África y los genotipos F y H, lo son de América del Sur y Central respectivamente.

Por lo que respecta a su determinación, hay que señalar que el método de referencia suele ser la secuenciación completa del gen S, seguida del análisis filogenético conjunto de las secuencias generadas y de referencia. Las técnicas de hibridación inversa (LiPA) también han demostrado ser útiles para el genotipado y además pueden identificar de una manera sencilla las infecciones mixtas. Otras alternativas pueden ser la PCR a tiempo real alelo específica, PCR múltiples genotipo específicas, RFLP y ensayos serológicos, siempre que sean validadas frente a la técnica de referencia.

En cuanto al significado clínico del genotipo viral en la infección por el VHB, hay señalar que el genotipo es una variable que potencialmente puede influir en el pronóstico de la infección y en el éxito de la terapia antiviral, debido a sus diferentes propiedades biológicas. Se han encontrado diferencias entre los distintos genotipos con respecto a la severidad de la enfermedad, estableciendo una incidencia o riesgo para el genotipo C superior al resto. No obstante, debe de hacerse énfasis en que todos los genotipos del VHB pueden conducir a las fases finales de la enfermedad hepática, incluyendo cirrosis y CHC. En cuanto a la respuesta al tratamiento, se ha observado que los genotipos C y D se asocian a una peor respuesta a la terapia basada en interferón que los genotipos A y B en términos de seroconversión del HBeAg. En los estudios realizados

con análogos de nucleósidos/nucleótidos (AN), no se ha demostrado por el momento ninguna relación entre los genotipos y la respuesta al tratamiento.

No obstante, a pesar de estas evidencias y de las tímidas recomendaciones aparecidas en las últimas guías, especialmente en la europea, se necesitan datos adicionales, antes de poder recomendar definitivamente su determinación en la práctica clínica, ya que a diferencia de la hepatitis C, el genotipo viral en la hepatitis B posee un pobre valor predictivo individual y sólo con él no se deben tomar decisiones vinculadas al tratamiento. Sin embargo, en la base de poder acumular líneas de evidencia, sería recomendable que todos los portadores del VHB fuesen rutinariamente genotipados para ayudar a identificar a aquellos que tienen un mayor riesgo de progresión de la enfermedad hepática y aquellos que puedan beneficiarse de la terapia antiviral óptima.

3.4.2.4. Caracterización de variantes genómicas

Se han descrito grupos de variantes genéticas que parecen tener implicaciones en el diagnóstico, patogénesis y tratamiento de la hepatitis crónica B. Entre estas variantes se encuentran las de la envuelta viral, las de la región precore/core, y las de la polimerasa viral, asociadas a la resistencia a antivirales.

3.4.2.4.1. Variantes en el gen S

Se han descrito mutantes de HBsAg entre los aminoácidos 121 y 149 de la región S (especialmente la mutación G145A), que pueden escapar a la protección de la vacuna. Además, la generación de estos mutantes de escape en el gen S puede ocasionar también reactivaciones del VHB en pacientes previamente inmunizados con inmunoglobulina específica anti-HBs, así como afectar a los inmunoensayos que detectan HbsAg.

3.4.2.4.2. Variantes en PC y PBC

Las variantes de la región precore/core (preC-C) impiden o disminuyen la expresión del HBeAg. Las principales variantes que impiden la expresión del HBeAg se detectan en la región preC y son especialmente aquellas que presentan la mutación G1896A que produce un codón de terminación en la posición 28. Las variantes que disminuyen la expresión del HBeAg contienen en su mayoría cambios en la región del promotor basal del core (PBC), principalmente la doble mutación A1762T y G1764A. Por estos motivos no se puede considerar al HBeAg estrictamente como un marcador de replicación viral, ya que su negatividad no se relaciona siempre con la ausencia de replicación.

Tabla 3. Datos de resistencia cruzada de las variantes más frecuentes del VHB. En la primera columna se muestran las sustituciones aminoacídicas; S: sensible, I: Intermedio, sensibilidad reducida, R: Resistente. *Detectada “in vitro”, rara vez “in vivo” (Adaptado de EASL, J Hepatol, 2012; 57:167-85).

Variante del VHB	Nivel de sensibilidad				
	Lamivudina	Telbivudina	Entecavir	Adefovir	Tenofovir
“Wild type”	S	S	S	S	S
M240V*	R	S	I	S	S
M240I	R	R	I	S	S
L180M + M204V	R	R	I	S	S
A181T/V	R	R	S	R	I
N236T	S	S	S	R	I
A181T/V + N236T	R	R	S	R	I/R
L180M + M204V/I ± I169T ± V173L ± M250V	R	R	R	S	S
L180M + M204V/I ± T184G ± S202I/G	R	R	R	S	S

La presencia de estas variantes (junto a la delección pre-S) suele asociarse a determinados genotipos virales y a formas más graves de enfermedad hepática con progresión a cirrosis y CHC, habiéndose incluso asociado alguna de ellas con el proceso de hepatocarcinogénesis y con casos de hepatitis fulminante. A este respecto, se ha descrito que el llamado genotipo mutacional complejo (MCG), que agrupa a las 8 mutaciones más frecuentes en las regiones X/PC (G1613A, C1653T, T1753V, A1762T, G1764A, A1846T, G1896A y G1899A) puede ser utilizado como indicador de riesgo (>6) para el desarrollo de CHC, pudiendo servir de guía en el algoritmo de cribado de éste en pacientes con hepatitis B.

La influencia de estas variantes sobre la respuesta a los agentes antivirales es muy controvertida.

3.4.2.4.3. Variantes en el gen POL

La terapia antiviral es hoy día la única opción para prevenir la progresión de la enfermedad crónica en la infección por el VHB. El objetivo de esta es reducir la carga viral al nivel más bajo posible, para asegurar un grado de supresión virológica que conduzca a la remisión bioquímica, mejora histológica y a la prevención de las complicaciones. Además, la reducción sostenida de la carga viral a niveles indetectables también es necesaria para reducir el riesgo de resistencia a los antivirales de acción directa (análogos de

nucleósidos y nucleótidos), ya que el principal problema concerniente al tratamiento prolongado con estos antivirales es sin duda la selección de variantes portadoras de mutaciones que les confieren resistencia (Tabla 3).

Actualmente, la terapia antiviral oral con los agentes de mayor potencia y barrera genética como el entecavir (ETV) y tenofovir (TDF) se ha convertido en el pilar del tratamiento de la hepatitis B, principalmente debido a los efectos de su profunda supresión viral potente y duradera y también debido en parte a la sencillez de su dosificación diaria y a la ausencia significativa de resistencias y efectos adversos.

Las mutaciones de resistencia se seleccionan en diferentes regiones del gen de la polimerasa y son específicas de cada fármaco o familia de fármacos, aunque también se han identificado mutaciones que pueden conferir resistencia cruzada entre los diferentes antivirales.

Entre estas sustituciones destacan para los L-nucleósidos (*lamivudina*, *telbivudina* y *emtricitabina*) las mutaciones en la región YMDD (rtM204V/I) y la mutación rtL180M que les confieren resistencia en los análisis *in vitro*. En los alquilfosfonatos, la resistencia a *adefovir* se ha asociado al cambio de aminoácido rtA181T y rtN236T en los dominios B y D de la polimerasa del

VHB; por lo que se refiere al *tenofovir*, su elevada barrera genética para el desarrollo de resistencias hace que la emergencia de estas en los pacientes a tratamiento sea excepcional. Por último, aunque la resistencia a ETV (*D-ciclopentano*) es infrecuente (<1.2%) en pacientes *naïves* a AN, sin embargo el riesgo es alto en pacientes que presentan o presentaron resistencia a lamivudina. Ésta se caracteriza por la presencia o selección de mutaciones en diferentes dominios de la polimerasa (B, C y E).

Aunque el estudio de estas variantes genéticas se presenta como una herramienta virológica clave para un correcto manejo terapéutico, en la actualidad, las pruebas de resistencia no se realizan de forma extensiva, al asumirse que los incrementos en la carga viral son indicativos de la resistencia antiviral.

Los métodos genotípicos de detección de resistencia se basan en los ensayos de secuenciación directa, hibridación reversa mediante sondas específicas (LIPA), la minisequenciación, RFLP, microarrays y PCR (convencional o a tiempo real). Los métodos fenotípicos están basados en ensayos enzimáticos de la polimerasa viral o en modelos de cultivo celular para el análisis de la replicación viral.

Los laboratorios Abbott cuentan con un sistema estandarizado de genotipado y detección de resistencias a antivirales basado en secuenciación (Abbott HBV sequencing, m2.000/ABI). La firma Seegene produce un sistema que detecta por PCR 3 mutaciones relacionadas con la resistencia a lamivudina (Seeplex HBV Lami-R Test). Otras multinacionales de diagnóstico microbiológico (Siemens, Fujirebio, etc) cuentan con sistemas estandarizados de genotipado y detección de resistencias a antivirales basados en secuenciación directa o hibridación reversa.

Por último, al igual que ocurre en la infección por el VIH, una aproximación al fenotipo virtual es otra opción para interpretar el genotipo que está disponible también para el VHB.

3.5. TRATAMIENTO

Las hepatitis B en fase aguda no tienen indicación de tratamiento dado que muchas de ellas son auto-limitadas. La decisión de tratar o no una hepatitis B crónica depende del grado de daño hepático, de la carga viral y de la presencia o no de HBeAg. Las diferentes guías de tratamiento cuentan con algoritmos al respecto.

Existen distintas opciones terapéuticas para el tratamiento de la hepatitis B. El interferón, preferentemente pegilado, cuenta con la ventaja de utilizarse en tratamientos relativamente cortos y no generar mutaciones de resistencia. Su tolerancia es el principal inconveniente.

Por otra parte y como se ha señalado, la terapia antiviral oral se ha convertido en el pilar del tratamiento de la hepatitis B, principalmente debido a los efectos de su profunda supresión viral y también debido en parte a la sencillez de su dosificación y a la ausencia de efectos adversos a pesar de su duración. Entre estos antivirales análogos de nucleósido y nucleótido se encuentran:

- *Lamivudina*. Ha sido uno de los fármacos más utilizados, el tratamiento es económico, pero selecciona fácilmente mutantes resistentes. Aunque cada vez se usa menos, actualmente se mantiene en los pacientes coinfectados con el VIH que cuentan con este fármaco en su régimen de tratamiento antirretroviral.
- *Adefovir*. Puede utilizarse para tratar pacientes infectados por cepas resistentes a lamivudina, aunque su potencia antiviral a dosis no nefrotóxicas no es óptima.
- *Telbivudina*. Cuenta con mayor actividad antiviral que la lamivudina y el adefovir, pero selecciona las mismas mutaciones de resistencia que la lamivudina y se han descrito casos de miopatías y neuropatías periféricas.
- *Entecavir*. Tiene una gran potencia antiviral y su tasa de resistencias es muy baja por su alta barrera genética constituyendo uno de los tratamientos de elección en la hepatitis crónica B.
- *Tenofovir*. También utilizado en las pautas de tratamiento del VIH, tiene una gran potencia antiviral, puede utilizarse en pacientes *naïve* o con historia de resistencias a lamivudina, telbivudina o entecavir. La selección de cepas resistentes es muy rara incluso después de 5 años de tratamiento.

Los tratamientos combinados, sugieren una potencia antiviral ampliada respecto a las monoterapias, una mayor respuesta viral sostenida y una mayor dificultad en la aparición de resistencias. Existe alguna experiencia en la combinación de lamivudina con interferón, adefovir o telbivudina así como de tenofovir con ente-

cavir. Los resultados, sin embargo, no son tan llamativos como cabría esperar.

3.6. PROFILAXIS

La transmisión del virus se produce por el contacto de sangre o fluidos corporales de pacientes infectados. Las principales formas de transmisión incluyen la vía sexual, la utilización de agujas y jeringuillas contaminadas en usuarios de drogas de administración parenteral y la transmisión perinatal. La infección nosocomial así como la transfusional prácticamente no existe en nuestros días. El mecanismo principal de transmisión en zonas de baja prevalencia (0,1-0,2%), es la vía sexual y en las zonas de alta prevalencia el uso de drogas intravenosas. Es interesante que a pesar de conocerse los mecanismos de transmisión, en al menos un 30% de los casos se desconoce el factor de riesgo de la infección.

Los medios más importantes para la prevención de la transmisión vienen constituidos por medidas generales de higiene, utilizar preservativo en las relaciones sexuales de riesgo, no compartir agujas ni jeringuillas, utilizar guantes si se va a entrar en contacto con sangre o fluidos biológicos, no compartir utensilios de higiene personal y utilizar material esterilizado o desechable en consultas de odontología, podología o centros donde se realizan tatuajes o "piercings".

La vacunación está teniendo un impacto innegable en la prevención de la infección y de las complicaciones asociadas a ella. En España, su inclusión en el ca-

lendario vacunal de las comunidades autónomas se inició en 1991 y se completó en el año 2002. Actualmente se administra en 3 dosis, a las 12 horas del nacimiento, a los 1-2 meses y a los 6-18 meses de edad. También puede administrarse a niños mayores no vacunados y a adultos, especialmente aquellos expuestos a situaciones de riesgo, y puede administrarse alguna dosis adicional de refuerzo, aunque su utilidad es controvertida incluso en las personas con respuesta limitada.

La inmunización pasiva con la administración de inmunoglobulinas también es de gran utilidad en determinadas situaciones como en el trasplante hepático por VHB para evitar la reinfección del injerto o en los niños nacidos de mujeres infectadas. En los pacientes inmunodeprimidos o que van a sufrir inmunosupresión es fundamental la vacunación y si existe la posibilidad de reactivación viral, se recomienda incluso la administración de tratamientos antivirales preventivos.

El tratamiento de los pacientes virémicos es también un factor clave para limitar la transmisión de la enfermedad.

4. HEPATITIS C

4.1. INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis C (VHC), identificado en 1989 pertenece a la familia *Flaviviridae* y su tamaño aproximado es de 60 nm. Posee ARN monocatenario de

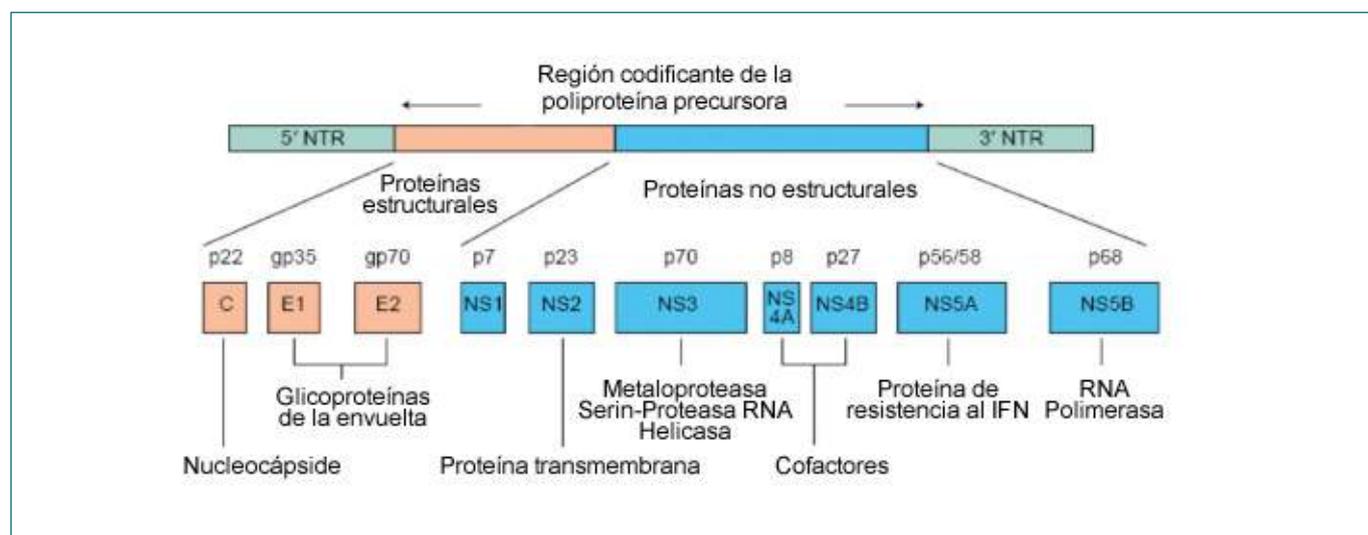


Figura 3. RNA del Virus de la Hepatitis C. Adaptado de Ashfaq et al. Genetic Vaccines and Therapy 2011;9:7.

polaridad positiva, de 9,5 kb, una nucleocápside icosaédrica (proteína C) y una envuelta (glicoproteínas E1 y E2) (Figura 3). Se caracteriza por una alta tasa de mutaciones debido a que la ARN polimerasa dependiente del virus no posee actividad exonucleasa 3'-5' correctora de errores, lo que se traduce en un incremento de la heterogeneidad del virus en cada ciclo de replicación. La heterogeneidad es manifiesta por los genotipos o variantes entre distintos individuos y por la existencia de cuasiepecies en un mismo individuo. El virus es capaz de originar infecciones agudas y persistentes. Se conocen 6 genotipos y, al menos, 50 subtipos diferentes.

La principal vía de transmisión de este virus es la parenteral (85%), por contacto percutáneo o de mucosas con material contaminado con sangre, hemoderivados o fluidos corporales infectados; la transmisión intrafamiliar por contactos percutáneos inadvertidos; y la sexual, poco probable, menos del 2% de los casos. En niños, el mecanismo más importante es la transmisión vertical (10%), y aumenta el riesgo en madres con elevada carga viral en el momento del parto y si asocia coinfección con VIH. Hasta 1992, momento en el cual empezó la detección del virus en hemoderivados y donantes de órganos, la vía de transmisión predominante era la vía parenteral. También se han descrito casos de transmisión por el uso de cocaína intranasal.

La prevalencia global de la infección es de aproximadamente un 3%, variando de un 0,4-1,1% en Europa Occidental y EE.UU., a un 9,6-28% en el Norte de África. En nuestro medio se estima alrededor de un 2-2,5%. En poblaciones de riesgo la prevalencia puede elevarse hasta un 70%. En los últimos años su incidencia se ha reducido al disminuir la transmisión por hemoderivados y al aplicarse las precauciones universales en las actuaciones médicas.

El VHC es el causante del 20% de los casos de hepatitis aguda pero, debido a su forma silente de presentación, rara vez se diagnostica. Solo un 25% de los casos desarrollan ictericia. Existe un periodo ventana de 4-8 semanas en el cual no hay un aumento de transaminasas, ni seroconversión anti-VHC, pero la viremia es detectable.

Aproximadamente el 80% de los infectados son portadores crónicos del virus, de estos un 10% mantienen valores de transaminasas (ALT y AST) normales durante muchos años mientras que, el 40% aproximadamente mantienen valores discretamente elevados con fluctuaciones moderadas, un 20% muestran valores

de transaminasas persistentemente elevados con riesgo de evolucionar a una cirrosis tras más de 20 años de evolución y solo un 10% aproximadamente pueden desarrollar una cirrosis hepática precozmente. Un 5% de los casos desarrollan hepatocarcinoma.

4.2. CLÍNICA

La infección por el VHC puede cursar de forma aguda o crónica. Las infecciones agudas son frecuentemente asintomáticas. Si existen síntomas, estos son inespecíficos, leves y desaparecen en pocas semanas. Las hepatitis agudas por VHC evolucionan a la cronicidad en un 80% de los casos y raramente presentan una evolución fulminante. La hepatitis crónica por VHC es la principal causa de cirrosis hepática y de trasplante hepático.

Aunque los síntomas no se correlacionan perfectamente con la evolución de la enfermedad, se describe fatiga, náuseas, anorexia, artralgias, mialgias y pérdida de peso, también dolor abdominal, prurito, coluria y deterioro cognitivo. Los niveles de transaminasas tampoco siguen una relación lineal con la evolución de la enfermedad.

Las mayores complicaciones de la infección por el VHC son la cirrosis, con descompensación hepática, ascitis, varices esofágicas, hemorragias y encefalopatía hepática y el carcinoma hepatocelular.

Son frecuentes, además, las manifestaciones extrahepáticas de la enfermedad de carácter autoinmune como la tiroiditis, la crioglobulinemia mixta, la artritis o la glomerulonefritis.

4.3. DIAGNÓSTICO

La primera aproximación diagnóstica ante una sospecha de infección por VHC debe de incluir una historia clínica completa y un examen físico del paciente. Será necesario solicitar una analítica general que debe incluir niveles de transaminasas séricas, bilirrubina, tiempo de protrombina y albúmina, marcadores de función renal, un panel lipídico, marcadores de función tiroidea y recuentos completos de células sanguíneas. Es importante también solicitar marcadores serológicos frente a otros virus hepatotropos y frente al VIH.

Generalmente está indicada una biopsia hepática para conocer la posible presencia de fibrosis y su grado (F0: ausencia de fibrosis, F1: fibrosis portal sin septos, F2: escasos septos, F3: septos abundantes sin cirrosis y

F4: cirrosis). Existen sistemas no invasivos, de uso creciente, para deducir de forma indirecta la presencia de fibrosis y su grado, como el fibrosacán.

En los últimos tiempos, han entrado en juego ciertos marcadores que parecen ser de utilidad para predecir el pronóstico de la infección así como la eficacia terapéutica con interferón pegilado y ribavirina frente al VHC. Se trata de los polimorfismos del gen de la interleuquina IL28B. Parece que los pacientes con genotipos favorables en las posiciones rs12979860 y rs8099917 en el gen de la IL28B, genotipos CC y TT respectivamente, tendrían mejores respuestas al tratamiento que los pacientes con genotipo CT o TT en rs12979860 y TG o GG en rs8099917. Los pacientes con genotipos favorables tendrían también una menor probabilidad de cronificar la infección y una mayor probabilidad de aclaramiento viral espontáneo. Existen sistemas comercializados, basados en PCR a tiempo real para el análisis separado y conjunto de los polimorfismos C/T (LightMix IL28B, Roche) en rs12979860 y T/G en rs8099917.

El diagnóstico microbiológico específico para la detección de la infección por el VHC se basa en la demostración de anticuerpos anti-VHC o antígenos por enzimoimmunoanálisis y detección del ARN viral por técnicas moleculares que permiten diferenciar diferentes estadios de la enfermedad (Figuras 4 y 5).

Las técnicas indirectas (anticuerpos) constituyen la primera línea diagnóstica y son indicativas de infección activa o pasada, mientras que las técnicas directas de demostración de viremia (ARN o antígenos) indican infección activa.

4.3.1. Marcadores serológicos

4.3.1.1. Detección de anticuerpos anti-HCV

Existen diferentes formatos de ensayo para la detección de anticuerpos anti-HCV en suero o plasma. Los más utilizados son los enzimoimmunoensayos (EIA) o su variante inmunoensayos quimioluminiscentes (CLIA) que aportan ventajas en cuanto a automatización, simplicidad de uso y productividad. Los ensayos de tercera generación detectan anticuerpos a antígenos recombinantes del core, NS3, NS4 y NS5. Son sistemas de alta especificidad y muy alta sensibilidad y su periodo ventana está en torno a las 6 o 7 semanas. Algunos ensayos de segunda generación todavía se comercializan. Difieren de los de tercera generación en sensibilidades y especificidades más limitadas y en su periodo ventana que puede llegar a las 10 semanas.

Existen tests rápidos basados en técnicas de inmunoadherencia por inmunofiltración o inmunocromatografía, para detectar anticuerpos anti-HCV con buenas sensibilidades y especificidades. Estos sistemas pueden ser utilizados con diferentes muestras como suero, plasma, sangre o incluso saliva y ofrecen resultados en menos de 30 minutos.

Otro formato disponible son los inmunoblots con antígenos recombinantes (RIBA y LIA). Estos sistemas permiten detectar anticuerpos del paciente frente a diferentes antígenos de forma independiente. Los resultados se evidencian sobre una tira de celulosa o nylon sobre la que se han depositado antígenos recombinantes. Son ensayos con excelente especificidad por

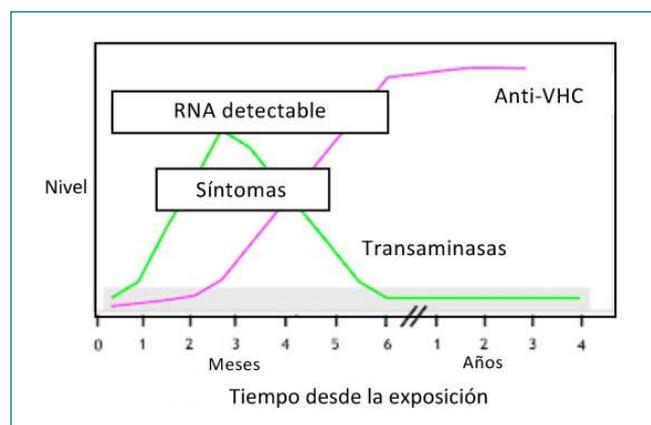


Figura 4. Marcadores analíticos en la infección autolimitada por VHC. Adaptado de *Recommendations for Prevention and Control of Hepatitis C Virus (HCV) Infection and HCV-Related Chronic Disease*. MMWR 1998: 47.

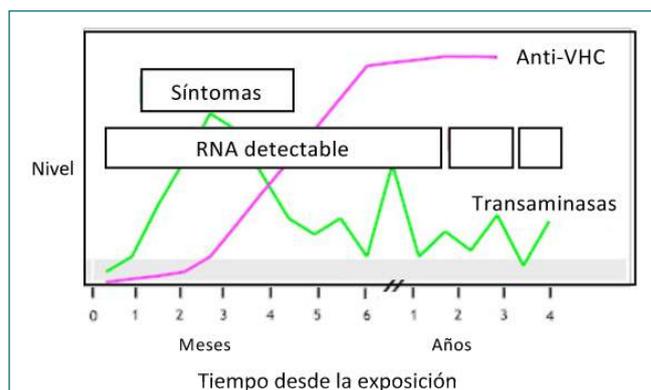


Figura 5. Marcadores analíticos en la infección crónica por VHC. Adaptado de *Recommendations for Prevention and Control of Hepatitis C Virus (HCV) Infection and HCV-Related Chronic Disease*. MMWR 1998: 47.

lo que suelen ser utilizados como confirmatorios y son útiles para descartar reacciones falsamente positivas de los tests de *screening*.

En recién nacidos de madres infectadas por el VHC y en algunos pacientes inmunodeprimidos, infectados por el VIH, receptores de trasplantes o pacientes en hemodiálisis, con una respuesta humoral reducida, es posible que no se detecten fácilmente los anticuerpos anti-VHC, especialmente si se utilizan sistemas con sensibilidades subóptimas. En estos casos, está indicada la utilización de técnicas moleculares para la detección del ARN del VHC para descartar la infección. La detección de anticuerpos también tiene una utilidad reducida en la sospecha de la infección muy reciente (Figura 4), debido al periodo ventana. En este caso, también debería utilizarse alguna técnica directa para la detección del virus dado que evidenciaríamos las primeras etapas replicativas del virus en las que se alcanzan altos niveles de viremia.

Los sistemas de detección de anticuerpos anti-HCV más utilizados están comercializados por Abbott (Architect, CLIA), Siemens (formato ELISA para BEP III y BEP 2000 Advance y formato CLIA para Advia Centaur XP), DiaSorin-Murex (ETI-, ELISA y Liaison® CLIA), BioRad (Monolisa™, formato ELISA), Ortho (Vitros ECi Immunodiagnostic System, CLIA), BioMérieux (VIDAS, ELISA en formato monotest,) y Roche (Elecsys®, CLIA).

Hay técnicas de diagnóstico rápido comercializadas para la detección de anticuerpos anti-HCV basadas en inmunocromatografía como la de ABON Biopharm, UK que detecta anticuerpos en suero o plasma u Ora-Quick® HCV (OraSure Technologies, USA) que admite sangre, suero, plasma e incluso exudados bucales.

Los principales proveedores de sistemas confirmatorios de detección de anticuerpos anti-HCV en formato RIBA o Western Blot son BioRad, Fujirebio y DiaSorin.

4.3.1.2. Detección de antígenos del VHC

Existen ensayos comerciales de detección de antígeno del core del VHC en suero o plasma, en formato de detección enzimática en microplaca (EIA) o por quimioluminiscencia (CLIA).

Se trata de ensayos de detección directa de viremia y, en cierto sentido, serían equivalentes a las técnicas de detección molecular. Cuentan con ciertas ventajas sobre la PCR, son mucho más económicas, pueden realizarse sin necesidad de acumular muestras y son

muy rápidas. Alguna ofrece resultados en 40 minutos. A pesar de estas ventajas, el uso de estas técnicas no está muy extendido, básicamente porque son menos sensibles en cargas virales bajas (no son reactivas por debajo de 5.000-10.000 UI/ml de ARN) y porque la técnica de referencia en muchas guías de diagnóstico y tratamiento es la PCR, que cuenta con muchísimos datos publicados que la avalan. A pesar de ello, la detección de antigenemia podría ser ventajosa en determinadas situaciones como el estudio del donante de órganos para trasplante, cuando se sospecha una infección muy reciente (periodo ventana de anticuerpos) o en las serologías dudosas. Algunos autores han propuesto incluso la posible utilidad de los ensayos de antigenemia en el seguimiento de pacientes virémicos hasta su negativización. En ese momento, podría pasarse al seguimiento con PCR consiguiéndose así un considerable ahorro.

Abbott cuenta con un ensayo de detección de antígeno por quimioluminiscencia (Architect HCV Ag), que se realiza en suero o plasma en pocos minutos. DiaSorin (MUREX DiaSorin HCV Ag/Ab) y BioRad (Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA) comercializan sendas aplicaciones tipo ELISA en microplaca que detectan de forma conjunta los anticuerpos anti-HCV y antígenos del core del virus.

4.3.2. Pruebas moleculares

4.3.2.1. Carga Viral del VHC

La detección del ARN-VHC en plasma implica infección activa y por lo tanto capacidad infectiva. Sin embargo, un resultado negativo (o indetectable) no excluye totalmente la infección, ya que el virus puede encontrarse en los hepatocitos o en los linfocitos.

Su determinación es útil en diversas circunstancias, así proporciona evidencias de infección aguda cuando los anticuerpos anti-VHC aun no son detectables, sirve para verificar el diagnóstico de infección vertical, confirma una hepatitis crónica C, confirma la infección en pacientes con una alteración de la inmunidad humoral y que no expresan el anti-VHC en plasma (inmunodeprimidos por trasplante, diálisis o tratamiento citostático), así como es muy importante en la monitorización de la respuesta al tratamiento antiviral.

Todos los ensayos de detección de ARN del VHC están calibrados utilizando estándares de la OMS, para asegurar su precisión y garantizar resultados comparables entre sí. Los estándares, sin embargo, se basan exclusivamente en secuencias genómicas del geno-

Tabla 4. Principales ensayos comerciales para la cuantificación del VHC.

FABRICANTE	ENSAYO	MÉTODO	LÍMITE DE DETECCIÓN (UI/ML)
Roche Diagnostics	COBAS Ampliprep /COBAS TaqMan HCV	PCR tiempo real	15
Siemens Medical Solutions Diagnostics	VERSANT HCV RNA 1.0 Assay (kPCR)	PCR tiempo real	15
Abbott Molecular	Abbott RealTime HBV	PCR tiempo real	12
QIAGEN Diagnostics	artus HBV QS-RGD Kit	PCR tiempo real	21

tipo 1. En cualquier caso, podría haber diferencias en cuantificación entre los diferentes ensayos, por lo que se recomienda el seguimiento de cada paciente con un único ensayo.

Existen multitud de técnicas para la cuantificación de la carga viral en plasma o suero (CV) del VHC que cuentan con la aprobación para su uso en la Unión Europea (marcado CE) (Tabla 4). A lo largo del 2014 o durante el 2015 van a lanzarse al mercado nuevos sistemas de PCR a tiempo real como VERIS MDx HCV (Beckman Coulter), HCV COBAS 6.800/8.800 (Roche) o Xpert HCV (Cepheid). Estos sistemas ofrecerán grandes ventajas como reactivos refrigerados listos para usar, carga continua o incluso formatos mono-test.

Aunque tradicionalmente, las técnicas se dividían en cualitativas y cuantitativas, en la actualidad, las primeras están cayendo en desuso y las cuantitativas cuentan con excelentes sensibilidades, permitiendo la detección hasta un nivel de 15 UI del VHC por mililitro de plasma y requieren entre 500 μ L y 1 mL de plasma o suero. Las diferencias técnicas fundamentales radican en los formatos, automatización, tiempos y capacidad de procesamiento. La mayoría de las técnicas utilizadas se basan en RT-PCR a tiempo real con sondas fluorescentes. Son rápidas y permiten rangos dinámicos amplios (15-10⁸ UI/mL). En todas ellas, la introducción de la extracción automática de ácidos nucleicos ha supuesto un considerable ahorro de trabajo manual y reduce las posibilidades de variabilidad en una de las fases más críticas del procedimiento. Otro tipo de técnicas moleculares, como el TMA (Transcription Mediated Amplification) o el bDNA (branched DNA), cuentan con un uso cada vez más limitado.

4.3.2.2. Genotipado del VHC

La determinación del genotipo es fundamental en la evaluación del paciente, para la predicción del pronóstico y la planificación del tratamiento. El método de referencia para el genotipado del VHC es la secuenciación directa de las regiones NS5B, E1 o E2 del genoma viral, pero se utiliza poco por su laboriosidad.

En la práctica clínica el genotipo puede determinarse mediante métodos comerciales basados en secuenciación de la región 5' no codificante (Trugene 5'NC HCV Genotyping Kit, Siemens), por hibridación inversa del producto amplificado con sondas genotipo-específicas de la misma región fijadas a un soporte de nitrocelulosa (Versant HCV Genotyping Assay, Siemens o LINEAR ARRAY HCV Genotyping Test, Roche) o PCR a tiempo real (Abbott HCV GTII). Seegene produce un sistema de genotipado por PCR multiplex (Seeplex, HCV genotyping kit). Roche cuenta con 2 sistemas en desarrollo que previsiblemente se comercializarán próximamente, COBAS[®] 4800 HCV Genotyping Test basado en PCR a tiempo real y un sistema de subtipado de alta resolución por secuenciación masiva y análisis filogenético. La mayoría de los métodos disponibles detectan correctamente los 6 genotipos principales, aunque algunos no logran identificar el subtipo en 10-25% de casos.

4.4. TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS CRÓNICA C

El tratamiento actual de la infección, con la combinación de interferón pegilado (Peg-IFN) y ribavirina (RIB), consigue respuesta viral sostenida en alrededor del 50% de los casos de los enfermos infectados por el

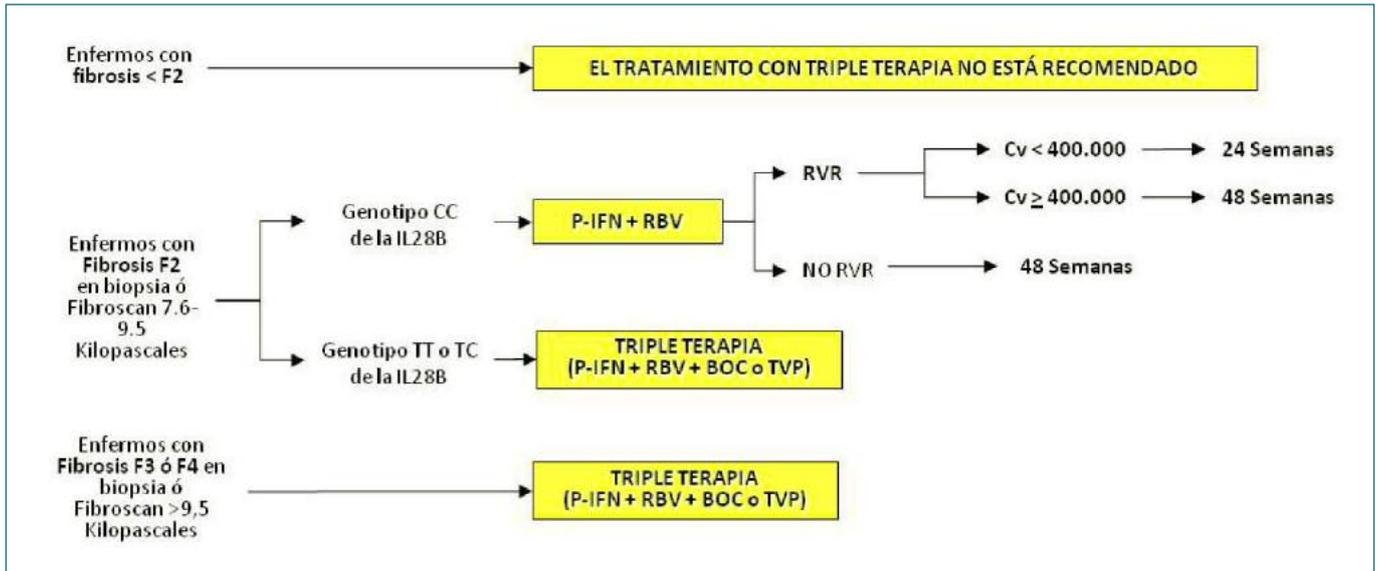


Figura 6. Algoritmo de tratamiento en pacientes naïve. P - IFN = interferón pegilado; RBV = Ribavirina; BOC = boceprevir; TVP = telaprevir; RVR = respuesta viral rápida; Cv = carga viral. En pacientes F2 en biterapia deben considerarse las reglas de suspensión para ribavirina e interferon pegilado habituales en práctica clínica (Tomado de: Informe de utilidad terapéutica UT/V1/28022012, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Gobierno de España).

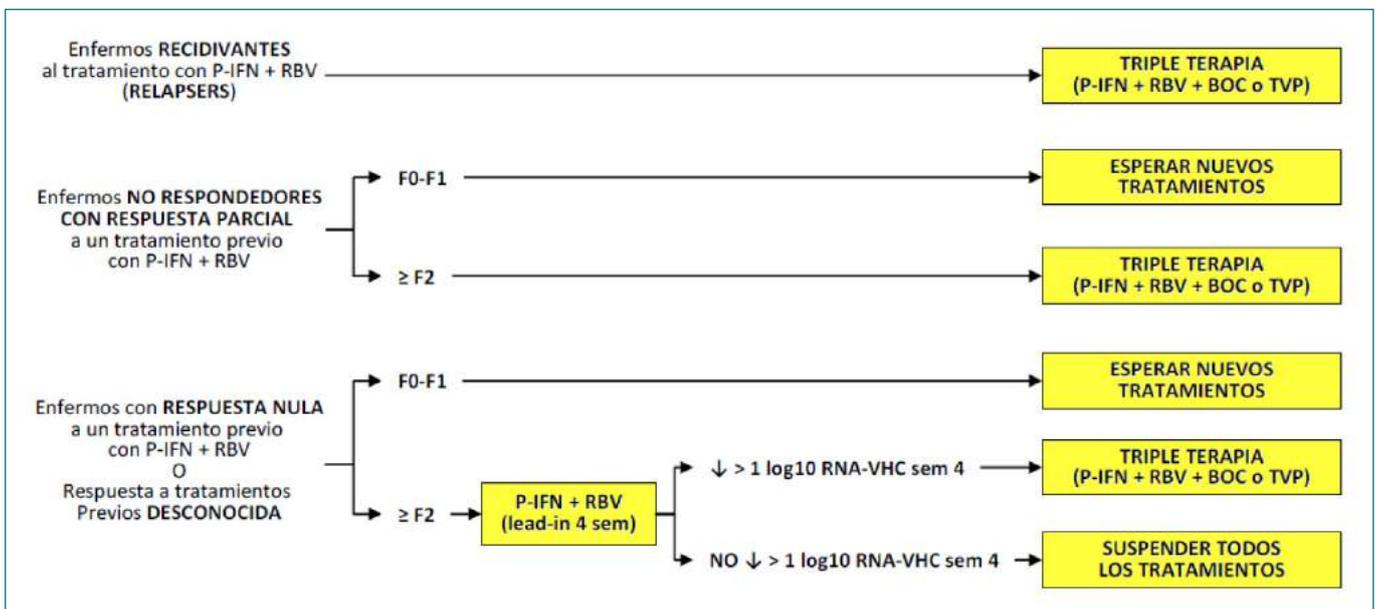


Figura 7. Algoritmo de tratamiento en pacientes previamente tratados. P - IFN = interferón pegilado; RBV = Ribavirina; BOC = boceprevir; TVP = telaprevir; RVR = respuesta viral rápida; Cv = carga viral (Tomado de: Informe de utilidad terapéutica UT/V1/28022012, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Gobierno de España).

genotipo 1, que es la forma más común en nuestro entorno (75% de los infectados).

La reciente comercialización de boceprevir (BOC) y telaprevir (TVP), los primeros inhibidores de la proteasa

del virus de la hepatitis C, supone un cambio esperanzador en el tratamiento de la hepatitis crónica por el VHC. La introducción de la triple terapia que incluye, además de Peg-IFN y RIB, un agente antiviral directo como telaprevir o boceprevir puede permitir que se al-

cance una tasa de curación del 75% en los enfermos infectados por el genotipo 1 que no hayan recibido tratamiento alguno (enfermos *naïve*) y de cerca del 50 % en los que no hayan presentado respuesta a un tratamiento doble previo. Boceprevir y telaprevir no están actualmente indicados en el tratamiento de la hepatitis crónica por el VHC causada por otros genotipos.

Según las recomendaciones del Ministerio de Sanidad de España el tratamiento de la hepatitis crónica C se realizará siguiendo los algoritmos recogidos en las figuras 6 y 7.

Existen otros fármacos inhibidores de la proteasa que están ofreciendo excelentes resultados como el Simprevir e incluso fármacos de otras familias como el Sofosbuvir (inhibidor de la polimerasa viral) que es, además, activo frente a virus de genotipos diferentes al 1 (2 y 3).

Hay otros muchos fármacos en diferentes etapas de desarrollo, más o menos próximas a su utilización en clínica, como el daclatasvir, faldaprevir, asunaprevir, mericitabine, danoprevir y micro-ARNs. Este panorama terapéutico tan prometedor, probablemente cambiará muchos aspectos de la infección por el VHC en un tiempo relativamente corto así como las necesidades del diagnóstico.

La incorporación de los nuevos agentes antivirales al tratamiento convencional plantea, sin embargo, problemas nuevos como es el manejo de los efectos adversos inducidos por estos medicamentos, y el acceso rápido a los resultados de las pruebas diagnósticas necesarias para actuar con racionalidad y eficiencia. Prolongar indebidamente el tratamiento, cuando no se produce respuesta, incrementa la aparición de mutaciones del virus que determina la formación de cepas resistentes, e incrementa innecesariamente el coste.

Estos tratamientos exigen unas reglas de suspensión muy estrictas reguladas por la carga viral, que se debe realizar de manera muy frecuente. Cualquier centro o unidad que utilice estos fármacos debe disponer de los resultados de la carga viral en menos de una semana.

4.5. PROFILAXIS

En el momento actual, no se dispone de una vacuna específica que pueda evitar esta infección, debido a la gran variabilidad genómica del VHC. La IgG polivalente tiene poca utilidad y no hay disponible una hiperinmune.

Como prevención son muy útiles una serie de medidas generales como la toma de las precauciones universales ante los fluidos humanos en el personal en general y, especialmente, en el relacionado con la salud, cambio en los comportamientos de prácticas de riesgo y estudiar las fuentes y posibles contagios.

Hay que evitar la transmisión parenteral mediante el control de los anticuerpos anti-VHC en los donantes de sangre y pacientes en hemodiálisis, la limitación en las transfusiones de sangre y hemoderivados, la lucha contra la drogadicción y el empleo de material desechable por los adictos a drogas por vía parenteral, usar guantes si se ha de tocar sangre de otra persona, no compartir objetos de higiene personal (por ejemplo, cepillos de dientes o maquinillas de afeitarse) con una persona infectada, comprobar que toda escoriación o perforación (tatuajes, pendientes, "piercings", etc.) sea hecha con instrumentos desechables o correctamente esterilizados y el uso del preservativo en las relaciones sexuales de riesgo.

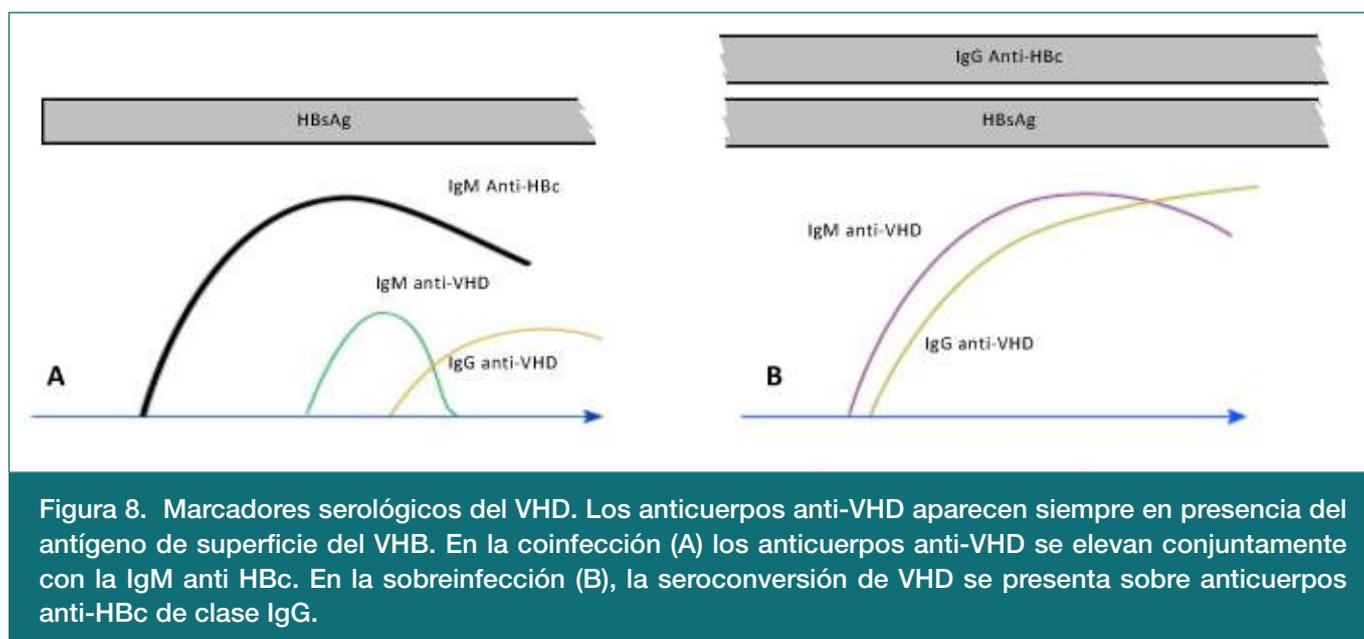
Para evitar la transmisión vertical no está recomendado el uso de la cesárea electiva, con la excepción de los casos de madre co-infectada por VIH. La lactancia materna no está contraindicada, siendo escasa la capacidad infecciosa de las partículas detectadas en leche asociadas al pH ácido del estómago que las inactiva. Aún así, habría que valorar los casos de madres con carga viral elevada y la presencia de grietas sangrantes en el pezón.

5. HEPATITIS DELTA

5.1. INTRODUCCIÓN

El agente etiológico de la hepatitis delta, el virus delta o virus D (VHD) es un virus defectivo que necesita la presencia del VHB para producir infección. El virión cuenta con una envuelta lipoproteica formada por el antígeno de superficie del VHB (HBsAg) y una estructura proteica interna donde reside el genoma viral. El genoma del virus está formado por una única hebra de ARN que forma un complejo con el único antígeno codificado por el propio virus, el HDAG.

La infección es muy frecuente en niños e individuos jóvenes. La transmisión es per mucosa o percutánea, frecuentemente intrafamiliar y se favorece con la falta de higiene. La infección por VHD debe sospecharse en pacientes que provienen de zonas endémicas (países de Europa del Este, Mediterráneos y América Central)



y en usuarios de drogas administradas por vía parenteral y nunca en ausencia de infección por VHB.

Las diferentes situaciones clínicas relacionadas con la infección del VHD como la coinfección VHB/VHD, la sobreinfección por VHD en pacientes ya infectados por VHB o la infección crónica por VHD pueden caracterizarse estudiando la presencia o ausencia del ARN viral, el HDAg y los anticuerpos anti-VHD.

5.2. CLÍNICA

Las presentaciones clínicas de la infección, pueden variar de formas agudas benignas, formas crónicas a veces asintomáticas a cuadros de hepatitis fulminante. La infección por VHD siempre ocurre en la presencia de VHB. Aunque parece demostrado que la replicación del VHD ralentiza o inhibe a la del VHB, frecuentemente ambos virus contribuyen al daño hepático resultando en una enfermedad de mayor severidad. Aunque no es regla general en todos los pacientes, es muy frecuente la rápida progresión de la enfermedad a cirrosis.

La infección simultánea por VHD y VHB (coinfección) normalmente condiciona una hepatitis aguda, muchas veces autolimitada e indistinguible de una hepatitis aguda por VHB exclusivamente. El porcentaje de pacientes que cronifican en la coinfección es similar al de pacientes que cronifican en la mono infección por VHB. La infección por VHD en pacientes previamente infectados por VHB (sobreinfección) suele tener un peor pronóstico, causa una hepatitis aguda severa o una exacerbación de una hepatitis B crónica. La evo-

lución a una forma crónica de hepatitis por VHD ocurre en casi la totalidad de los pacientes.

5.3. DIAGNÓSTICO

Es importante recalcar que no debe buscarse la presencia de VHD en ausencia del VHB. En muchas ocasiones, además, será necesario detectar determinados marcadores del VHB, para realizar una caracterización precisa de la infección por VHD. El diagnóstico microbiológico del VHD se basa en la detección y/o cuantificación de antígenos, anticuerpos y del genoma del virus. Las muestras de elección son el suero y, en determinadas ocasiones, la biopsia hepática.

5.3.1. Marcadores serológicos

5.3.1.1. Detección de HDAg en suero

El HDAg puede detectarse en sistemas tipo EIA o RIA, aunque su utilización no es frecuente en los laboratorios de diagnóstico sino más bien en laboratorios de referencia o investigación muy especializados.

En la infección aguda, la antigenemia es muy transitoria y puede, por ello, pasar desapercibida. Es ligeramente más duradera en los pacientes inmunodeprimidos. En la fase crónica, aunque existen altos títulos de HDAg y su presencia circulante es más prolongada, la mayor parte están formando complejos con anticuerpos, por lo que su detección es más compleja. Es posible, sin embargo, su detección bajo condiciones desnaturantes capaces de romper los complejos antígeno/anticuerpo.

DiaSorin comercializa un kit ELISA en microplaca para la detección de antígeno de VHD (HDAg).

5.3.1.2. Detección de anticuerpos anti-VHD

Existen sistemas de detección de anticuerpos totales (IgG+IgM) así como sistemas que detectan separadamente anticuerpos anti-VHD de clase IgG e IgM. Los formatos más frecuentes son de EIA en microplaca.

Los primeros anticuerpos se elevan a las pocas semanas de la infección. La seroconversión es una buena forma de diagnosticar la infección en estas fases iniciales. La presencia exclusiva de anticuerpos de clase IgM es también indicativa de esta fase de la infección. Aunque la IgM desaparece pronto en las formas auto-limitadas y en las formas agudas, puede ser muy perdurable en las formas crónicas, especialmente en las sobreinfecciones (VHD sobre VHB). Una buena forma de diferenciar las sobreinfecciones de las coinfecciones (VHD + VHB) es que en éste último caso, coexiste la IgM anti-VHD con la IgM anti-HBc (Figura 8). Es frecuente que, en pacientes con infección crónica, La IgM muestre un declive (e incluso desaparezca) después del tratamiento efectivo o después del trasplante. DiaSorin comercializa dos sistemas para la detección de anticuerpos anti-VHD, ETI-AB-DELTA-2 (anticuerpos totales) y ETI-DELTA-IGMK-2 (anticuerpos de clase IgM).

5.3.2. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares en la infección (coinfección/sobreinfección) por el VHD están basados en la detección y caracterización del ARN del VHD.

5.3.2.1. ARN del VHD

El ARN del VHD es el marcador de replicación viral en la infección por el VHD y permanece detectable en todos los pacientes con infección aguda y crónica. Este marcador se negativiza con el aclaramiento viral ya sea de modo espontáneo o bien por acción del tratamiento.

A diferencia del VHB y VHC, la carga viral del VHD no se correlaciona con ningún marcador clínico de actividad o del estado de la enfermedad hepática; sin embargo su cuantificación sí tiene utilidad en la monitorización del tratamiento antiviral cuando está indicado. Por lo que se refiere a la detección y cuantificación del ARN del VHD los métodos comercializados que están disponibles se basan en la transcripción inversa del ARN viral seguida de la amplificación del ADNc por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) generalmente a tiempo real. La disminución del nivel

de ARN del VHD y del título de HBsAg durante el tratamiento, puede representar un indicador del éxito terapéutico.

Conviene tener presente que, aunque la infección activa por el VHD ha sido diagnosticada históricamente por la presencia de anticuerpos anti-VHD de clase IgM en el suero del paciente, hoy en día ésta se confirma también por la detección en suero del ARN del VHD mediante ensayos basados en la reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) a tiempo real. Estos ensayos moleculares no están indicados en ausencia de anticuerpos específicos frente al VHD ya que no se ha descrito la infección oculta por el VHD. Por otra parte, debido a la variabilidad en la secuencia del genoma viral y a la ausencia de métodos estandarizados lo suficientemente sensibles y específicos la detección actual del ARN del VHD puede producir resultados falsamente positivos y negativos, por lo que se hace necesaria la estandarización internacional de dichos ensayos, sobre todo teniendo en cuenta que un resultado positivo en el ARN-VHD aconseja la realización de una biopsia hepática para cuantificar la severidad de la enfermedad.

Roche produce y comercializa un reactivo para la cuantificación de la carga viral del VHD, LightMix HDV. Se trata de un sistema de amplificación por PCR a tiempo real adaptado al equipo LightCycler. Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l también produce un sistema de amplificación a tiempo real para cuantificación de la carga viral de este virus.

5.3.2.2. Genotipos del VHD

En base a su variabilidad genética, se han descrito 8 genotipos del VHD con diferentes propiedades y distribución geográfica. La infección por el genotipo 1, el más prevalente en Europa, está asociada con un peor pronóstico de la enfermedad.

Aunque el genotipado del VHD está sólo disponible en centros especializados, paulatinamente está ganando aceptación como una herramienta diagnóstica útil ya que los pacientes infectados con el genotipo 1 tienen un alto riesgo de desarrollar enfermedad hepática fulminante y además presentan menores tasas de respuesta al tratamiento con interferón pegilado que los pacientes infectados con otros genotipos.

Por lo que se refiere a su determinación, ésta se basa en la secuenciación directa de las secuencias virales amplificadas por RT-PCR y su posterior análisis filogenético con secuencias de referencia.

5.3.3. Marcadores tisulares de la infección

Tanto la detección del HDAg como del ARN de VHD pueden realizarse sobre biopsias hepáticas. Para detectar HDAg se utilizan técnicas de inmunofluorescencia directa o tinciones inmunohistoquímicas. El ARN viral se detecta por hibridación *in situ* o PCR *in situ*. Aunque tradicionalmente se ha considerado como *gold standard* la ausencia de virus en tejido hepático para considerar a un paciente curado, es cierto que las técnicas histológicas son tediosas, lentas y de difícil interpretación y que las técnicas de detección de genomas y antígenos en sangre circulante son cada vez más sensibles y específicas, por lo que las primeras han entrado en desuso en la actualidad.

5.4. TRATAMIENTO

El objetivo del tratamiento es erradicar la infección o, al menos, conseguir una supresión virológica duradera del VHD y del VHB.

La supresión de la replicación del VHD se evidencia por la negativización del ARN viral o del HDAg en suero y en hígado. Indirectamente, el control de la infección por HBV también tiene un efecto en el del VHD, por lo que es deseable el aclaramiento del HBsAg y la elevación del anti-HBs. La presencia de anti-HBs previene de la infección por VHB y de VHD. Sin embargo, pacientes que han aclarado el HDAg pero no cuentan con anti-HBs pueden volver a infectarse por VHD.

El único fármaco aprobado para la infección por el VHD es el interferón alfa (IFNa) en su forma estándar o pegilada (Peg-IFNa). Se desconoce su mecanismo de acción, pero parece que pudiera basarse en su actividad sobre el VHB más que sobre el propio VHD o en sus efectos inmunomoduladores.

El tratamiento de la hepatitis delta continúa siendo un problema de difícil solución. Por una parte, la terapia disponible hoy no es diferente del tratamiento basado en interferón, utilizado desde hace más de 20 años. La experiencia ha demostrado que el tratamiento con Peg-IFNa (considerado de dudosa eficacia clínica por la EASL) puede conducir a la respuesta viral sostenida del ARN-VHD (RVS) en aproximadamente la cuarta parte (20-25% de respuesta bioquímica y virológica) de pacientes (en cualquier caso, la recidiva es muy frecuente tras suspender el tratamiento).

Por otra parte, los inhibidores de la polimerasa no son eficaces frente al VHD. Tal como ha demostrado el

estudio HIDIT-I (Hep-Net-International Delta Hepatitis Intervention Trial) al encontrar que el tratamiento con PegIFN alfa-2a durante 48 semanas, con o sin adefovir, da como resultado la eliminación/aclaramiento sostenido del ARN-VHD en el 25% de los pacientes con infección por el VHD. En la actualidad se está realizando el Ensayo HIDIT-II, mediante la combinación de Peg-IFN alfa-2a y tenofovir durante un periodo de tiempo de 96 semanas y seguimiento de 358 semanas, se estima que estará completado en mayo de 2017.

En cuanto a las nuevas opciones de tratamiento, se incluyen los inhibidores de la prenilación y los inhibidores de la entrada del VHB los cuales están en las primeras fases de desarrollo clínico. Los inhibidores de la prenilación pueden ser prometedores, por que la replicación del VHD depende de un paso de prenilación (importante para la unión entre proteínas durante el proceso de interacción del HDAg y la envoltura del VHB). Los inhibidores de la prenilación impiden el ensamblaje y salida del virión del VHD, y en consecuencia previenen la propagación de la infección.

La utilización de otros compuestos con una amplia eficacia antiviral, como la nitazoxamina, podrían ser interesantes en la investigación frente al VHD. Finalmente, varios IFNs alternativos bajo desarrollo clínico incluyendo el IFNλ también se podrían explorar para la hepatitis D.

En conclusión, para que la curación de la infección por el VHD deje de ser una misión imposible, fuera del escenario del trasplante hepático, es necesario trabajar en la búsqueda de nuevos tratamientos que puedan suprimir al VHD más eficientemente que el Peg-IFN, consiguiendo la prevención a largo plazo de las secuelas de la infección.

5.5. PROFILAXIS

La principal medida profiláctica es la vacunación frente al VHB. La profilaxis pasiva con inmunoglobulina anti-HBV no ha demostrado prevenir completamente la reinfección por VHD en pacientes trasplantados.

Existen diferentes estudios de administración de vacunas específicas frente a VHD en modelos animales. Las vacunas ensayadas se basan en fragmentos del HDAg modificados por tratamientos químicos, producidos por ingeniería genética o de péptidos sintéticos del citado antígeno. Aunque los resultados son prometedores en cuanto a su capacidad inmunógena, se

duda de la rentabilidad económica en su producción y administración dado que, la vacuna de la hepatitis B es efectiva frente a la hepatitis D y que sería necesario identificar primero a la población que se podría beneficiar de su uso (portadores crónicos de HBsAg).

6. HEPATITIS E

6.1. INTRODUCCIÓN

Se trata de la primera causa de hepatitis e ictericia en el mundo con 20 millones de nuevas infecciones, 3 millones de hepatitis agudas y 57.000 muertes cada año. La hepatitis E es una infección viral de transmisión típicamente oro-fecal, fundamentalmente a través de aguas contaminadas. Está descrita también la transmisión transfusional y perinatal, aunque estas son anecdóticas. Sus características clínicas son las de una hepatitis aguda similar a la producida por el VHA.

El virus de la hepatitis E (VHE) fue descrito por primera vez en 1990. Pertenece a la familia *Hepeviridae* y constituye el género *Hepevirus*. Se trata de un virus ARN, de polaridad positiva y pequeño tamaño, sin envuelta, icosaédrico y de genoma sencillo. Existen 4 genotipos descritos, de los cuales el I y el II afectan exclusivamente al hombre y el III y el IV al hombre y a los animales, muy especialmente al ganado porcino.

Su mecanismo de transmisión es muy similar al de la hepatitis A y, al igual que ésta, la hepatitis E generalmente no se cronifica. El virus alcanza el hígado por mecanismos aún desconocidos y, tras replicarse en este órgano, se acumula en la vesícula biliar, desde donde alcanza el intestino a través del conducto biliar para, posteriormente, ser excretado en las heces en grandes cantidades. Aunque la enfermedad generalmente presenta una baja mortalidad (0,2-0,3%), puede llegar a ser extremadamente grave en mujeres embarazadas, en las que con frecuencia origina un fallo hepático fulminante con tasas de mortalidad entre el 20-30% y en pacientes inmunodeprimidos. Por otro lado, en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas, la infección por el VHE puede desencadenar una descompensación hepática grave.

6.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y DIAGNÓSTICO CLÍNICO

El periodo medio de incubación de la hepatitis E es de unos 40 días. La elevación de los valores séricos de

enzimas hepáticas se produce normalmente entre los 30 y 120 días después de la infección. La excreción fecal del VHE comienza alrededor de una semana antes del inicio de los síntomas de la enfermedad y continúa durante 2 ó 3 semanas después. La fase "ictérica" se caracteriza por la aparición de una coloración amarillenta en la piel y mucosas, asociada a un cuadro similar a la gripe (malestar general, pérdida del apetito, dolor de las articulaciones, fiebre, náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, etc.). También se puede observar coluria, heces de color arcilloso, hepato- y esplenomegalia, eritema y rash con prurito, etc. Sin embargo, la mayor parte de las infecciones por el VHE son asintomáticas.

6.3. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Su cultivo es difícil y no se suele utilizar en laboratorios de diagnóstico clínico. Los inmunoensayos enzimáticos constituyen la herramienta de diagnóstico principal para la detección de anticuerpos frente al VHE. Durante la infección aguda por el VHE los anticuerpos de clase IgM se elevan casi simultáneamente a los de clase IgG. Los anticuerpos IgM disminuyen hasta desaparecer transcurridos 4 ó 5 meses. La respuesta tipo IgG se va incrementando desde la fase aguda hasta la de convalecencia, pudiendo permanecer con altos títulos hasta 4 años después de la fase aguda de la enfermedad. La detección de anticuerpos de clase IgM tiene utilidad diagnóstica en la infección aguda, mientras que la presencia de IgG como único marcador, indica infección pasada por el VHE. La detección de partículas virales en heces mediante inmunomicroscopía electrónica se utiliza poco por ser una técnica compleja y además poco eficaz. El genoma (ARN) del VHE se puede detectar en heces y en suero mediante RT-PCR. Su detección indica infección activa.

El diagnóstico virológico directo de la infección por el VHE no suele estar disponible en la cartera de servicios de la mayoría de los laboratorios de microbiología de nuestro sistema sanitario, por su falta de demanda al considerarse todavía como una enfermedad importada. Su creciente incidencia, incluso en países industrializados como el nuestro, está haciendo plantearse esta necesidad.

En la actualidad, el diagnóstico se basa fundamentalmente en la detección de marcadores serológicos, como los anticuerpos específicos frente al virus, y últimamente en la detección molecular del ARN del VHE mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (RT-PCR).

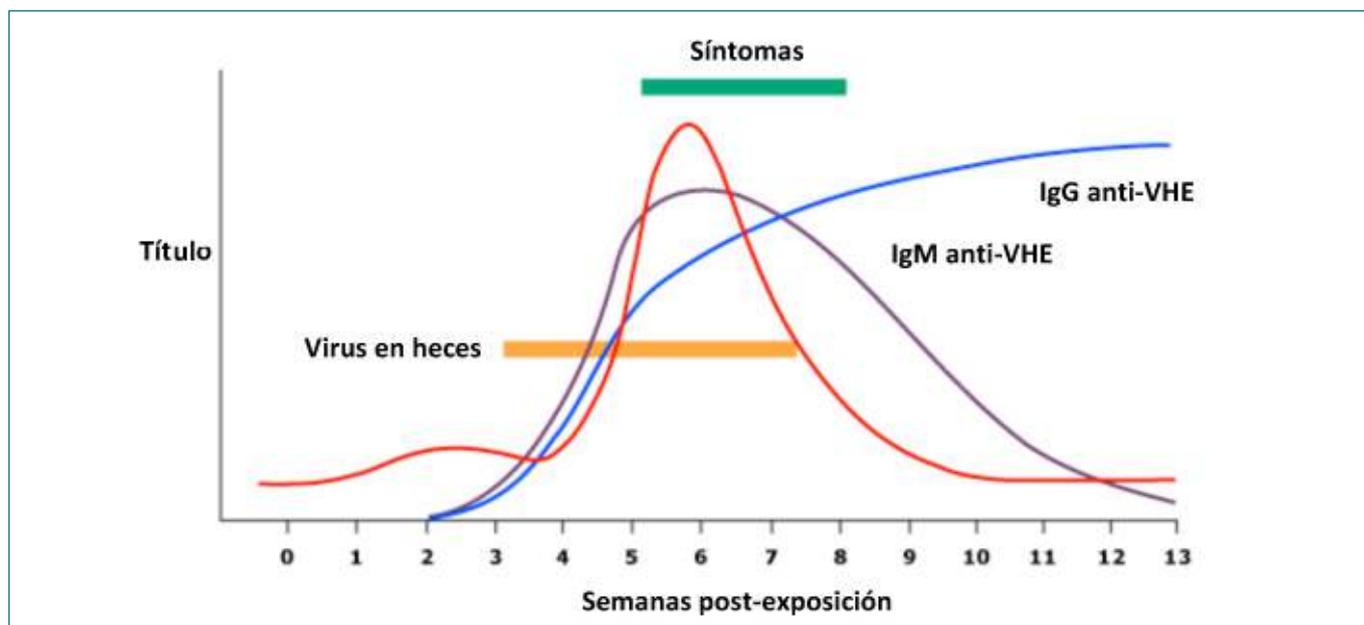


Figura 9. Marcadores analíticos de la infección por VHE. Adaptado de www.cdc.gov/hepatitis/index.htm.

6.3.1. Marcadores serológicos

El diagnóstico de la infección por el VHE es muy similar al de la infección por el VHA y está basado en la detección indirecta de anticuerpos específicos de tipo IgM e IgG que constituyen los marcadores serológicos de la infección (Figura 9).

6.3.1.1. IgM anti-VHE

El diagnóstico de la infección aguda por el VHE se fundamenta en la detección de los anticuerpos específicos de tipo IgM (IgM anti-VHE) que son los primeros en aparecer y que permanecen detectables durante periodos prolongados, aunque experimentan una disminución progresiva desde el final de la fase aguda.

6.3.1.2. IgG anti-VHE

Los anticuerpos específicos de clase IgG (IgG anti-VHE) se hacen detectables casi a la vez que los de clase IgM y permanecen detectables durante años y no sirven para diferenciar la infección aguda de la pasada, si bien su presencia junto a los de tipo IgM y a un incremento significativo en su titulación de hasta 4 veces apoyan el diagnóstico de hepatitis E. Su presencia en solitario en ausencia de clínica es indicativa de infección pasada. No está claro si los anticuerpos IgG anti-VHE confieren una acción protectora eficaz y si mantienen títulos duraderos.

Un aspecto importante a tener en cuenta en el diagnóstico de la hepatitis E es la ausencia de inmunoensayos comerciales robustos para detectar los anti-

cuerpos IgG e IgM frente al VHE, lo que ha supuesto que la mayoría de datos de prevalencia e incidencia de los que se dispone sean poco concluyentes. La mayoría de los inmunoensayos enzimáticos comerciales que detectan anticuerpos específicos de clase IgG e IgM utilizan como moléculas de captura antígenos recombinantes y presentan una pobre sensibilidad y una gran variabilidad entre los mismos.

Hasta ahora no había muchos sistemas comerciales para la detección de anticuerpos anti-VHE. En los últimos tiempos, sin embargo, se están desarrollando y comercializando gran cantidad de nuevos productos. DiaSorin cuenta con 2 kits en formato de ELISA/microplaca, uno para detección de anticuerpos de clase IgG y otro para detección de IgMs (Murex Anti-HEV IgG y Murex HEV IgM). Entre los nuevos desarrollos se pueden destacar los kits de Mikrogen Diagnostics, GE (recomLine IgG/IgM tipo RIBA o recomWell IgG/recomWell IgM ELISA), Fortress Diagnostics, UK (tipo ELISA anticuerpos totales, IgG e IgM) o DIA.PRO. IT (anticuerpos totales anti-VHE).

6.3.2. Marcadores moleculares

6.3.2.1. ARN del VHE

Al igual que en otras infecciones cuyo diagnóstico se basa en la detección indirecta, el diagnóstico de infección aguda por el VHE basado en la detección de anticuerpos de clase IgM se puede confirmar mediante la detección molecular del ARN del VHE.

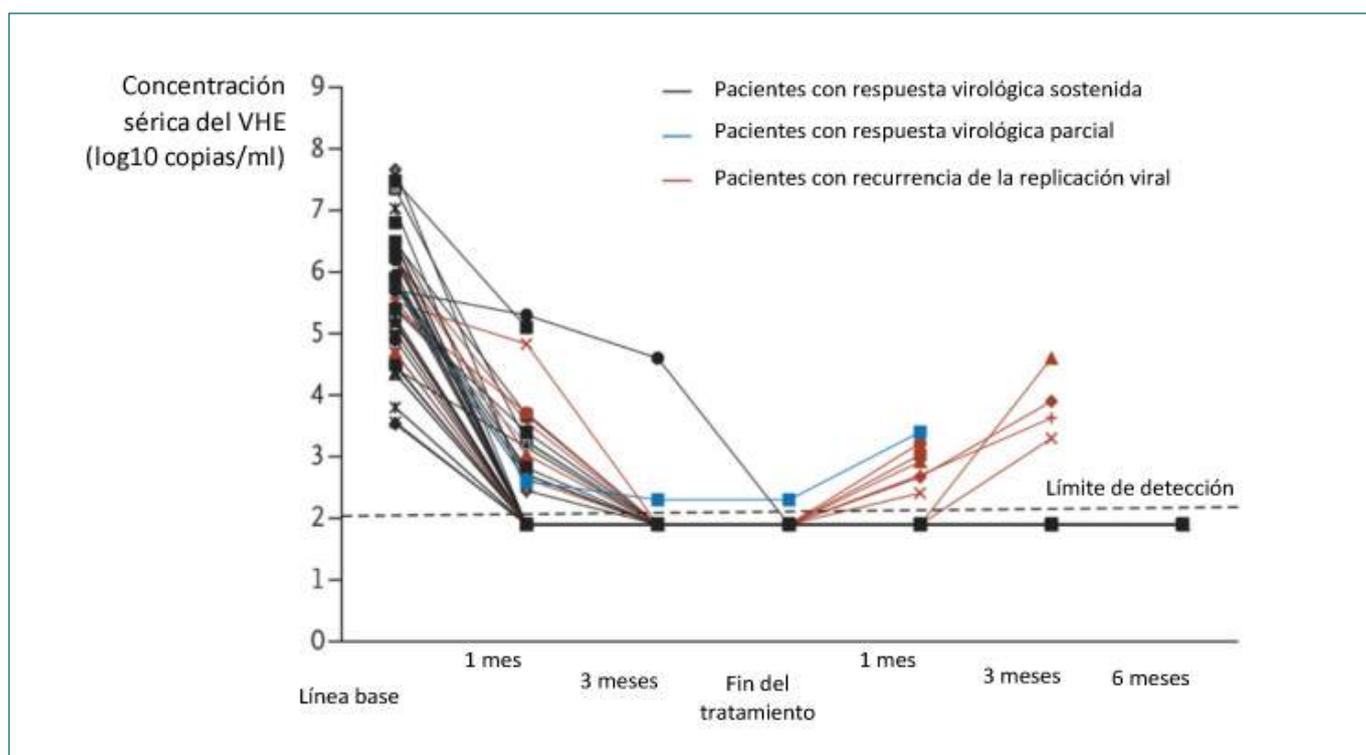


Figura 10. Concentración sérica del VHE durante el tratamiento con Ribavirina. (Adaptado de N Kamar et al., *N Engl J Med* 2014, 370:1111-1120).

La detección del ARN del VHE mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (RT-PCR) convencionales o con formato en tiempo real, realizadas en el propio laboratorio o comerciales, es una alternativa para el diagnóstico y confirmación de la infección por el VHE, en muestras de suero o heces. A pesar de su variabilidad en los parámetros de sensibilidad y especificidad, especialmente en aquellos desarrollados en el propio laboratorio, estos ensayos moleculares son los más adecuados para utilizar en el diagnóstico de pacientes inmunodeprimidos.

Una aplicación determinante del ARN del VHE es el diagnóstico de la infección crónica (que es excepcional) por el VHE, definida por la presencia persistente de dicho ARN-VHE en el suero del paciente durante al menos 6 meses.

Roche cuenta con un producto destinado a la cuantificación de la carga viral del VHE (LightMix HEV) y otro en desarrollo (COBAS® HEV para el COBAS® 6.800); Mikrogen GE produce un sistema de cuantificación del ARN del VHE por PCR a tiempo real (AmpliCube); Altona Diagnostics también produce un sistema de detección cualitativa de ARN del virus (RealStar HEV RT-PCR kit 1.0).

6.3.2.2. Genotipo viral

La caracterización molecular del VHE mediante secuenciación de los fragmentos genómicos amplificados y posterior análisis filogenético con las secuencias de las cepas de referencia permite clasificarlo en cuatro genotipos bien conocidos (1-4). Este método presenta la ventaja de poder caracterizar los nuevos genotipos, así como la presencia de aquellos asociados a casos de zoonosis, hepatitis fulminante, manifestaciones extrahepáticas, etc.

6.3.3. Técnicas rápidas y otras

Existen pruebas rápidas de inmunoadherencia por inmunocromatografía para detectar anticuerpos específicos de clase IgM que todavía cuentan con muy escasa comercialización en nuestro país.

También está disponible la detección directa de los viriones por inmunomicroscopía electrónica en muestras fecales, aunque reservada a laboratorios de referencia o investigación.

6.4. TRATAMIENTO

El tratamiento de la hepatitis E es generalmente innecesario dado que la infección sintomática es muy fre-

cuentemente autolimitada. Existe, sin embargo, alguna experiencia en el tratamiento de determinados grupos de pacientes, como los receptores de trasplantes, aunque es experimental y ningún fármaco ha sido aprobado para este uso. El tratamiento con ribavirina (600-800 mg/día durante 12 semanas) o combinada con Peg-IFN ha demostrado reducir la carga viral de VHE y proporcionar una supresión virológica mantenida (Figura 10).

6.5. PROFILAXIS

Es fundamental la aplicación de medidas generales de higiene para prevenir la infección. La utilidad de la administración de inmunoglobulinas pre o post-exposición es muy dudosa. Desde hace algunos años están siendo investigadas en diferentes fases de ensayos clínicos dos vacunas recombinantes que han demostrado seguridad e inmunogenicidad aceptable en sus primeros resultados.

7. HEPATITIS G Y OTROS VIRUS

7.1. VIRUS TT (VTT) Y OTROS ANELLOVIRUS

El virus TT (VTT) se describió en 1997 como asociado a hepatitis post-transfusionales de etiología desconocida. El nombre vino dado por las iniciales del nombre del paciente del que se aisló por primera vez.

Aunque inicialmente ciertas características del virus tales como su alta concentración en hígado frente a plasma y que se asociaba a altos niveles de transaminasemia apuntaban a su naturaleza hepatotropa, en la actualidad este hecho es controvertido.

El VTT se clasifica dentro de la familia *Anelloviridae* en el género *Alfatorquetenovirus*. La familia incluye otros 2 virus humanos muy relacionados, el Torque Teno Minivirus (VTTM) y el Torque Teno Midivirus (VTTMD) con genomas de 2,8 y 3,2 kb y un gran número de representantes que infectan a una gran variedad de animales. Estos virus son muy similares al VTT en cuanto a morfología, distribución etc.

Los viriones tienen morfología esférica, no tienen envuelta y su diámetro es aproximadamente de 30 nm. Su genoma está formado por una molécula de ADN circular de cadena sencilla de 3,8 kb. El genoma presenta varias ORFs parcialmente solapadas con una alta variabilidad entre cepas y una zona altamente conservada no codificante de 130 nucleótidos. El alto

grado de polimorfismos condiciona la presencia de un gran número de genotipos que se agrupan en 5 grupos filogenéticos (1-5) con diferencias de secuencia del 40% de nucleótidos. Los grupos 1 y 3 son los más frecuentes y el grupo 2 el más raro. La variante más caracterizada se denomina virus SEN (VSEN) que en realidad, agrupa varios genotipos dentro del grupo 3. La distribución del VTT es más amplia de lo que se pensó inicialmente y su prevalencia en la población general es muy elevada, pudiendo oscilar entre el 2% comunicado en el Reino Unido y el 62% en Brasil (11% en España). Algunos autores proponen incluso prevalencias del 80-90% en la población general.

La infección por el VTT parece que se adquiere en momentos tempranos de la vida, ya que se ha aislado con alta frecuencia a partir de plasma y otros fluidos corporales de niños.

Su significación clínica es muy controvertida. Parece que, con la excepción de grupos especiales de pacientes como aquellos con algún tipo de inmunodepresión, el virus no es causante de cuadros hepatitis aguda. Parece que el porcentaje de pacientes que desarrollan una hepatitis aguda no A – no E, no es significativamente diferente en pacientes con viremia por TTV y sin ella. Paralelamente, no parece haber asociación entre el VTT y alteraciones bioquímicas o histológicas en pacientes con hepatitis crónica, según evidencian distintos estudios de casos y controles.

Existen, sin embargo, algunos estudios, que podrían mostrar algún tipo de asociación causal. Un estudio en Japón, parece demostrar que la prevalencia de TTV fue significativamente superior en un grupo de pacientes con hepatitis crónica de etiología desconocida que en un grupo de pacientes con hepatopatía por VHC. También se ha publicado que en niños, la coinfección TTV-VHB se asocia con una peor histología. Otro estudio, a favor de la relación causal, indicaría una prevalencia del 1% en donantes sanos mientras que en pacientes con cirrosis criptogénica y fallo hepático fulminante sería del 15% y del 27% respectivamente. Este mismo estudio indicaría una prevalencia del 18% en pacientes con cirrosis con historia de exposición a productos sanguíneos mientras que en pacientes cirróticos sin ella, sería del 4%.

Se ha publicado también puntualmente asociaciones de TTV con lupus sistémico eritematoso, diabetes mellitus, cáncer de esófago y pancreático y esclerosis múltiple.

El virus VTT se ha aislado de la práctica totalidad de los tejidos del cuerpo, con excepción del sistema nervioso central y se excreta en grandes cantidades en las heces, orina, saliva y fluidos nasales, además es muy resistente al medio ambiente y su vía de transmisión comprende rutas muy diversas.

El diagnóstico se basa en la utilización de técnicas de amplificación genética debido a la dificultad de su cultivo. Se ha comunicado la existencia de distintos sistemas de detección de anticuerpos IgG e IgM frente al virus, aunque los sistemas comerciales, tanto de PCR como de serología están en fase de desarrollo.

7.2. VIRUS DE LA HEPATITIS G (VHG O VGB-C)

Inicialmente descritos como dos virus diferentes, se ha visto que tienen secuencias genéticas con muy alta homología, y por lo tanto, que se trata del mismo virus. El VHG se clonó inicialmente de un cirujano infectado cuyas iniciales eran GB y de ahí su nombre. Se trata de un virus ARN de la familia *Flaviviridae*.

La distribución de VHG es universal y su prevalencia es alta incluso en países desarrollados e industrializados. Existen pocas evidencias de su implicación en patología humana. Aunque el ARN de VHG se ha detectado en pacientes con hepatitis aguda no-A no-E, en pacientes con hepatitis crónica, en pacientes con cirrosis criptogénica e incluso en pacientes con carcinoma hepatocelular, su alta tasa de coinfección con el VHC hacen difícil su valoración como agente etiológico. El virus también se ha detectado en pacientes con hepatitis post-transfusional, pero con frecuencia los picos de viremia y de elevación de transaminasas son discordantes. Otra observación interesante es que la proporción de ARN viral en tejido hepático frente a la de suero, suele ser inferior a uno, lo cual sugiere contaminación sanguínea en las biopsias hepáticas más que replicación viral en el propio hígado.

Por mencionar algunos trabajos que apuntan a la posible patogenicidad del virus, en Japón se han descrito casos de hepatitis fulminante post-transfusionales en los que sólo se ha podido demostrar la presencia de genoma de VHG. Aunque algunos autores apuntan a la necesidad de incluir la detección de este virus en el *screening* de bolsas de sangre, actualmente no existen grandes evidencias que obliguen a su implantación.

La coinfección por VHG en pacientes VIH positivos parece tener un cierto efecto protector a nivel de los lin-

focitos T-helper y de la producción de citoquinas. Ese efecto protector sería muy evidente en pacientes no tratados y no tanto en pacientes tratados con antirretrovirales y no prevendría frente a la transmisión vertical del virus.

El virus se diagnostica por amplificación de su ARN por medio de sistemas de RT-PCR. También es posible detectar anticuerpos frente al virus. Parece que la elevación de los anticuerpos se correlaciona con el aclaramiento del ARN viral por lo que dichos anticuerpos tendrían un efecto protector. No existen, sin embargo, grandes desarrollos comerciales para el diagnóstico del virus.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Gómez J, Gobernado M. Enfoque clínico de los grandes síndromes infecciosos. 5ª edición. 2013. ISBN: 978-84-15351-42-9.
2. Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002; 122:1554-1568.
3. Nainan OV, Xia G V, Vaughan G, Margolis HS. Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 63-79.
4. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *J Hepatol* 2012; 57:167-185.
5. Kao JH. Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2008; 2: 553-562.
6. Pawlotsky JM, Dusheiko G, Hatzakis A, Lau D, Lau G, Jake LT, et al. Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: recommendations for a standardized approach. *Gastroenterology* 2008; 134. 29: 405-415.
7. Berg T, Sarrazin C, Herrmann E, Hinrichsen H, Gerlach T, Zachoval R, et al. Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology*. 2003;37: 600-609.
8. Caliendo AM, Valsamakis A, Zhou Y, Yen-Lieberman B, Andersen J, Young S, et al. Multilaboratory comparison of hepatitis C virus viral load assays. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1726-1732.
9. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Brillet R, Pawlostky JM. Overestimation and underestimation of hepatitis C virus RNA levels in a widely used real-time polymerase chain reaction-based method. *Hepatology*. 2007;46:22-31.
10. Colson P, Motte A, Tamalet C. Broad differences between the COBAS Ampliprep total nucleic acid isolation-COBAS TaqMan 48 hepatitis C virus (HCV) and COBAS HCV Monitor v2.0 assays for quantification of serum HCV RNA of non-1 genotypes. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1602-1603.

11. Davis GL. Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36 Suppl 1:S145-151.
12. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of Hepatitis C Virus Infection. *J Hepatol* 2014; 60: 392-420.
13. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff B, American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*. 2009;49:1335-1374.
14. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2007;45(2):507-539.
15. Mellors J, Hawkins A, Simmonds P. Genotype dependence of hepatitis C virus load measurement in commercially available quantitative assays. *J Clin Microbiol*. 1999;37:2525-2532.
16. Pyne MT, Konnick EQ, Phansalkar A, Hillyard DR. Evaluation of the Abbott investigational use only RealTime hepatitis C virus (HCV) assay and comparison to the Roche TaqMan HCV analyte-specific reagent assay. *J Clin Microbiol*. 2009, 47(9):2872-2878.
17. Sarrazin C, Gärtner BC, Sizmman D, Babiell R, Mihm U, Hofmann WP, et al. Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. *J Clin Microbiol*. 2006;44:729-737.
18. Schutten M. Comparison of the Abbott Realtime HIV-1 and HCV viral load assays with commercial competitor assays. *Expert Rev Mol Diagn*. 2008;8:369-377.
19. Sizmman D, Boeck C, Boelter J, Fischer D, Miethke M, Nicolaus S, et al. Fully automated quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA in human plasma and human serum by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system. *J Clin Virol*. 2007;38:326-333.
20. Tuaille E, Mondain AM, Ottomani L, Roudière L, Perney P, Picot MC, et al. Impact of hepatitis C virus (HCV) genotypes on quantification of HCV RNA in serum by COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV test, Abbott HCV RealTime assay, and VERSANT HCV RNA Assay. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3077-3081.
21. Vermehren J, Kau A, Gärtner BC, Göbel R, Zeuzem S, Sarrazin C. Differences between two real-time PCR-based hepatitis C virus (HCV) assays (RealTime HCV and Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan) and one signal amplification assay (Versant HCV RNA 3.0) for RNA detection and quantification. *J Clin Microbiol*. 2008;46:3880-3891.
22. Aragona M, Macagno S, Caredda F, Crivelli O, Lavarini C, Maran E, Farci P, Purcell RH, Rizzetto M. Serological response to the hepatitis delta virus in hepatitis D. *Lancet* 1987;1(8531):478-480.
23. Hughes SA, Heiner W, Harrison PM. Hepatitis delta virus. *Lancet* 2011; 378:73-85.
24. Pascarella S, Negro F. Hepatitis D virus: an update. *Liver Inter* 2011; 31:7-21.
25. Taylor, J, Negro, F, Rizzetto, M. Hepatitis delta virus: from structure to disease expression. *Rev Med Virol*. 1992; 2(3):161-167.
26. Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Lhomme S, Dubois M, Perron JM, Alric L, et al. Performance of two commercial assays for detecting hepatitis E virus RNA in acute or chronic infections. *J Clin Microbiol*. 2013; 51:1913-1916.
27. Aggarwal R. Diagnosis of hepatitis E. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013; 10:24-33.
28. Baylis SA, Hanschmann KM, Blümel J, Nübling CM. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J Clin Microbiol*. 2011; 49:1234-1239.
29. Bendall R, Ellis V, Ljaz S, Ali R, Dalton H. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J Med Virol*. 2010; 82:799-805
30. Crespo Pérez L. y Rivero Fernández M. Información al paciente Hepatitis E. *Rev Esp. Enferm Digest*. 2008; 100(8): 514.
31. Hoofnagle JH, Nelson KE, Purcell RH. Hepatitis E. *N Engl J Med* 2012; 367:1237-1244.
32. Kamar N, Izopet J, Tripon S, Bismuth M, Hillaire S, Dumortier J, et al. Ribavirin for chronic hepatitis E virus infection in transplant recipients. *N Engl J Med* 2014; 370:1111-1120.
33. Khuroo MS, Khuroo MS. Hepatitis E virus. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21:539-543.
34. Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck ZY, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271(5248):505-508.
35. Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol* 2008; 80:646-658.
36. Alter HJ. The cloning and clinical implications of HGV and HGBV-C. *N Engl J Med* 1996; 334(23):1536-1537.
37. Di Bisceglie AM. Hepatitis G virus infection: a work in progress. *Ann Intern Med* 1996; 125:772-773.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Marcadores serológicos de las hepatitis B y C	PNT-HV-1	
		Edición N° 01	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El diagnóstico de la hepatitis vírica supone la mayor parte de la carga de trabajo de un laboratorio de serología microbiana tanto por la gran demanda que conlleva como por la complejidad de los marcadores serológicos asociados.

Este documento trata de orientar en los procedimientos básicos de diagnóstico serológico de las hepatitis B y C.

2. FUNDAMENTO

Existen diferentes sistemas de detección de anticuerpos y antígenos del VHB. La mayoría de ellos utilizan inmunoensayos enzimáticos en microplaca (EIA), fluorescentes (ELFA) o quimioluminiscentes (CLIA) con partículas magnéticas. En la infección por VHC, las determinaciones primarias de anticuerpos (y antígenos) se realizan también por EIA o por CLIA, mientras que los ensayos confirmatorios de la presencia de anticuerpos anti-VHC se suelen realizar mediante ensayos de inmunoblot con antígenos recombinantes y péptidos sintéticos (RIBA/LIA).

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimientos relacionados con la recepción y registro de muestras.
- Procedimientos relacionados con higiene y seguridad en el procesamiento.
- Manuales de instrucciones de los sistemas diagnósticos.

4. MUESTRAS

La muestra de elección es el suero aunque, dependiendo del fabricante, el plasma puede ser una alternativa.

Las muestras se obtendrán por venopunción en el tubo adecuado (seco, tapón amarillo para suero o con EDTA, tapón morado para plasma, no se recomiendan otros anticoagulantes) y serán transportadas cuanto antes al laboratorio (no más de 4 horas).

Los tubos se centrifugarán a 1.000-1.500xg durante 10 minutos y el suero/plasma será transferido a tubos limpios, bien identificados, para su ensayo y conservación. Se intentará mantener los tubos a temperatura ambiente el mínimo tiempo posible. Las muestras separadas se mantendrán a 4°C un máximo de 72h. Para periodos mayores se conservarán en congelación a -20°C o preferiblemente a -70°C.

Las muestras serán rechazadas cuando no se ajusten a las descritas en el párrafo anterior (por ejemplo, LCR, orina etc.), cuando se reciban en recipientes no adecuados, cuando se hayan conservado de forma no adecuada o cuando existan problemas de identificación.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Se utilizarán los reactivos, controles y calibradores propios de cada determinación. No se utilizarán materiales de dudosa procedencia o conservación ni aquellos que hayan superado su fecha de caducidad.

6. APARATOS Y MATERIAL

Deberán utilizarse las plataformas adecuadas para cada técnica siguiendo las indicaciones de cada fabricante.

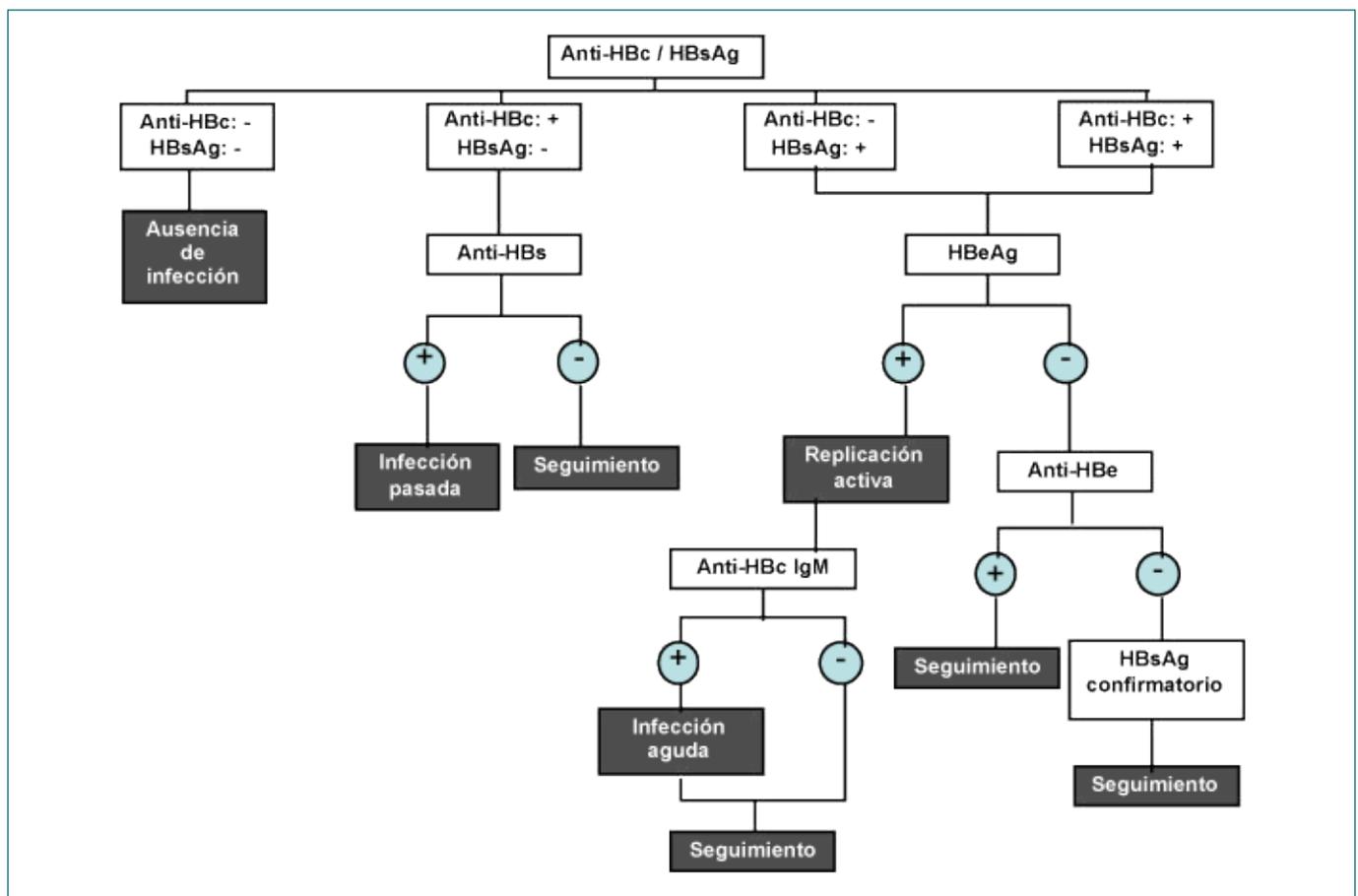
Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Marcadores serológicos de las hepatitis B y C	PNT-HV-1	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

Se utilizará también material general de laboratorio tanto inventariable como fungible.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. VHB.

El sistema de *screening* primario de infección, tradicionalmente incluye la determinación de anti-HBc (IgG+IgM) conjuntamente con la de HBsAg. Las muestras con *screening* positivo, serán sometidas a una serie de determinaciones, como las reflejadas en cascada, lo cual reduce el número de pruebas innecesarias. Existen distintos algoritmos propuestos. El siguiente esquema propone uno de ellos.



Dado que la opción anti-HBc (-) / HBsAg (+), es rara (periodo ventana), y que las determinaciones de anti-HBc actualmente son extremadamente sensibles, se ha llegado a considerar la posibilidad de un *screening* primario exclusivamente con anti-HBc, en el que su positividad desencadenaría la determinación del HBsAg. Este *screening* simplificado puede tener grandes limitaciones en ciertos contextos por lo que debería evitarse si se sospecha infección muy reciente, en muestras de pacientes severamente inmunodeprimidos, en estados de hipogammaglobulinemia o en situaciones donde excluir un periodo ventana es de vital importancia (por ejemplo, donaciones de órganos o hemodiálisis),

Si la solicitud corresponde a valoración del estado de inmunidad en pacientes sanos, se realizará exclusivamente la cuantificación de anticuerpos anti-HBs.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Marcadores serológicos de las hepatitis B y C	PNT-HV-1	
		Edición N° 01	Página 4 de 6

Simplificando al máximo, los anticuerpos **anti-HBc totales (IgG+IgM)**, con un periodo ventana aproximado de 2-3 semanas, indicarían contacto con el virus y, en general, no se negativizan. Los anticuerpos **anti-HBs** son los que proporcionan inmunidad (bien por curación de una infección o por vacunación) y son cuantificables (tradicionalmente se hablaba de protección por encima de 10 mUI/mL, aunque en la actualidad, la presencia, aún por debajo de esa cantidad, en individuos vacunados o curados, presupone la existencia de células B de “memoria” y por tanto de protección frente a la infección). El **HBsAg** indica infección activa e infectividad y si permanece detectable durante al menos 6 meses indica infección crónica. El **HBeAg** es el indicador de alta replicación viral y desaparece del suero al ser neutralizado por los anticuerpos **anti-HBe** (que normalmente se elevan antes que los anti-HBs). Los **anti-HBcIgM** son marcadores de infección aguda y suelen desaparecer a las pocas semanas.

Algunas situaciones poco habituales son:

- Pacientes con anti-HBc (+), HBsAg (-) y anti-HBe (-): existen algunas posibles explicaciones: infección muy reciente en periodo ventana (generalmente anti-HBcIgM (+)); infección resuelta, muy antigua donde se ha perdido el anti-HBs; infección antigua con niveles de HBsAg indetectables aunque presentes o falso positivo del ensayo de anti-HBc.
- Pacientes con anti-HBc (+) que tienen simultáneamente HBsAg y anti-HBs o HBeAg y anti-HBe: solapamiento transitorio entre aclaramiento antigénico y elevación de anticuerpos o pacientes cuyos anticuerpos no son capaces de neutralizar el virus.
- Infección oculta, se trata de pacientes con viremia detectada por PCR pero con marcadores de infección negativos. Normalmente se trata de mutantes que escapan a los sistemas diagnósticos o sensibilidades insuficientes de los ensayos diagnósticos para concentraciones escasas de los marcadores serológicos.

La presencia de anti-HBc total y HBsAg en ausencia de HBeAg y anti-Hbe es poco habitual por lo que en este caso podría ser de utilidad confirmar la presencia del HBsAg. Su confirmación nos obligará a considerar la infección crónica. Los ensayos confirmatorios de HBsAg utilizan sistemas competitivos de captura.

En la figura 1 y en la tabla 1 se resumen diferentes situaciones de la infección por VHB según sus marcadores serológicos.

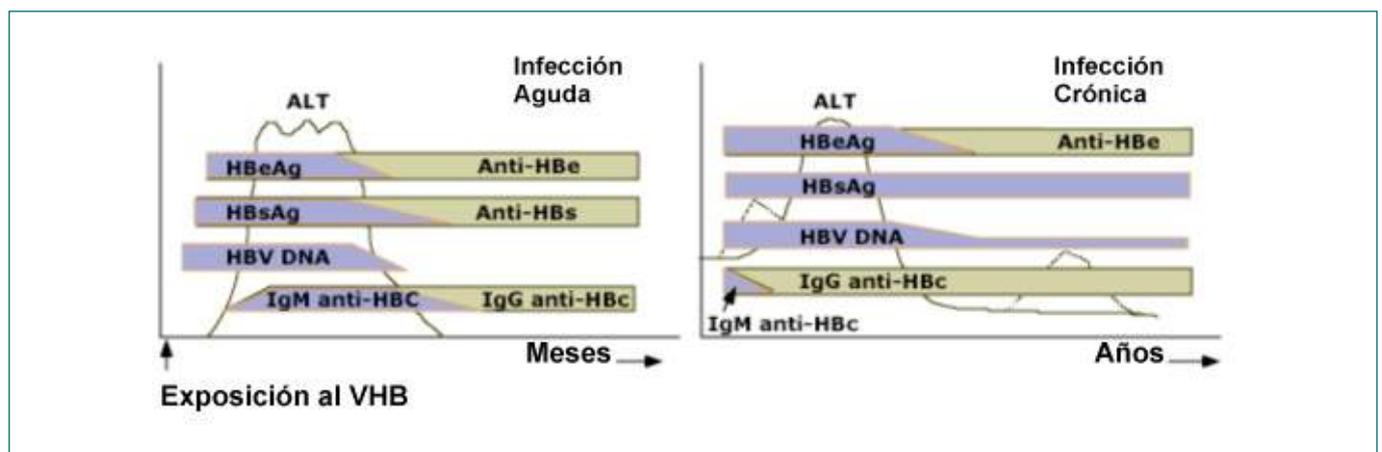


Figura 1. Marcadores analíticos de la Hepatitis B en su forma aguda (izda.) y crónica (dcha.). Adaptado de UpToDate (hepatitis B, gráfico 69344).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Marcadores serológicos de las hepatitis B y C	PNT-HV-1	
		Edición N° 01	Página 5 de 6

Tabla 1. Perfiles serológicos más frecuentes en relación con el VHB. ⁽¹⁾ durante más de 6 eses)

Situación del individuo o paciente	anti-HBc IgM	Anti-HBc IgG	HBsAg	Anti-HBs
Ausencia de infección y susceptibilidad	-	-	-	-
Infección pasada e inmunidad	-	+	-	+
Inmunidad vacunal	-	-	-	+
Infección aguda	+	+ / -	+	-
Infección crónica	-	+	+ ⁽¹⁾	-
“Core aislado”	-	+	-	-

7.2. VHC.

La detección primaria de anticuerpos anti-VHC se realiza habitualmente con inmunoensayos enzimáticos, fluorescentes o quimioluminiscentes. Las muestras anti-VHC positivas pueden ser confirmadas con técnicas tipo inmunoblot.

Algunos laboratorios tienen disponible la detección de antígeno del core de VHC. Aunque su positividad se correlaciona claramente con la presencia de replicación viral, la implementación de este marcador no está muy extendida. La detección del antígeno de VHC podría ser equivalente a la cuantificación por PCR en determinados rangos de viremia (medios o altos). Este marcador podría utilizarse también en determinadas situaciones como pruebas confirmatorias negativas o indeterminadas o cuando, la exclusión de un periodo ventana de una forma inmediata, sea de vital importancia (por ejemplo, donaciones de órganos o hemodiálisis).

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los siguientes marcadores se podrían expresar como “Se detectan anticuerpos” o “No se detectan anticuerpos”: anti-HBc (IgG+IgM), anti-HBs (acompañado de valores cuantitativos), anti-HBe, anti-HBc (IgM), antiHBs confirmatorio, anti-VHC y anti-VHC confirmatorio.

Los siguientes marcadores se podrían expresar como “Se detectan antígenos” o “No se detectan antígenos”: HBsAg, HBeAg y VHCaAg.

Otras opciones de expresión de resultados como “Reactivo” o “No reactivo” pueden ser válidas aunque son menos precisas.

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento analítico se llevará a cabo por personal técnico cualificado con formación específica. La coordinación y la supervisión de la técnica, de los resultados emitidos, su interpretación y su validación, se realizará por el facultativo especialista en Microbiología responsable del laboratorio. El equipo en pleno tendrá la responsabilidad de velar por ofrecer la máxima garantía de calidad en el proceso.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Marcadores serológicos de las hepatitis B y C	PNT-HV-1	
		Edición N° 01	Página 6 de 6

10. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Todas las técnicas implicadas tienen excelentes sensibilidades y especificidades, pero nunca del 100%. Por ello, es posible la presencia de resultados falsos positivos y falsos negativos. Ante cualquier sospecha de este tipo de resultados, deberá repetirse la prueba con la misma técnica o con técnicas alternativas.

La detección de marcadores de la infección por VHB y VHC aporta mucha información sobre el tipo de infección y su momento, sin embargo, no es suficiente para el manejo del paciente y por ello es necesario el seguimiento de la infección y del tratamiento con marcadores moleculares (ADN y ARN viral mediante métodos de amplificación genómica).

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Colomina J, González D, Burgos A, Fernández N, Guerrero A. Significado de la reactividad aislada anti-HBc como único marcador de infección de la hepatitis B. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23:80-85.
2. Lok ASF. Serologic diagnosis of hepatitis B virus infection. *UpToDate* 2013 (www.uptodate.com).
3. Terrault NA, Chopra S. Screening for chronic hepatitis C virus infection. *UpToDate* 2014 (www.uptodate.com).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Marcadores moleculares de las hepatitis B y C	PNT-HV-2	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Las técnicas moleculares de seguimiento de la infección por el VHB y el VHC fueron las primeras de esta naturaleza en desarrollarse e implantarse en nuestros laboratorios y hoy en día son, sin duda, las más estandarizadas.

Este documento revisa los procedimientos básicos de detección y seguimiento de la infección por los virus de las hepatitis B y C con técnicas basadas en tecnología de ácidos nucleicos.

2. FUNDAMENTO

Las técnicas más utilizadas para la detección de la carga viral del VHB y del VHC se basan en la amplificación del ADN por PCR o del ARN por RT-PCR a tiempo real con sondas marcadas con fluorescencia.

Para el genotipado viral y para la detección de resistencias a fármacos antivirales se utilizan PCR (o RT-PCR), hibridaciones reversas con formatos tipo LiPA y técnicas de secuenciación.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimientos relacionados con la recepción y registro de muestras.
- Procedimientos relacionados con higiene y seguridad en el procesamiento.
- Manual de instrucciones de los sistemas diagnósticos.

4. MUESTRAS

Las muestras recomendadas por la mayoría de los fabricantes son el plasma y el suero. Otras muestras como el LCR o el plasma seminal, no cuentan con la validación expresa de los fabricantes, y si se utilizan, este hecho deberá de ponerse en conocimiento de los solicitantes.

Las muestras de sangre serán obtenidas por venopunción en el tubo adecuado (tubo con EDTA, tapón morado para plasma o tubo seco, tapón amarillo para suero, no se recomiendan otros anticoagulantes) y serán transportadas cuanto antes al laboratorio (no más de 4 horas).

Los tubos se centrifugarán a 1.000-1.500xg durante 10 minutos y el plasma/suero será transferido a tubos limpios, bien identificados, para su ensayo y conservación. Las muestras separadas se mantendrán idealmente a -70°C hasta su procesamiento, aunque su conservación a -20°C es adecuada para periodos cortos de tiempo (1-3 días).

Las muestras serán rechazadas cuando no se ajusten a las descritas en el párrafo anterior, cuando se reciban en recipientes no adecuados, cuando se hayan conservado de forma no adecuada o cuando existan problemas de identificación.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Se utilizarán los reactivos, controles y calibradores propios de cada determinación. No se utilizarán materiales de dudosa procedencia o conservación ni aquellos que hayan superado su fecha de caducidad.

6. APARATOS Y MATERIAL

Deberán utilizarse las plataformas adecuadas para cada técnica siguiendo las indicaciones de cada fabricante.

Se utilizará también material general de laboratorio tanto inventariable como fungible.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Marcadores moleculares de las hepatitis B y C	PNT-HV-2	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

7. PROCEDIMIENTO

Deberán seguirse las indicaciones de los proveedores de las técnicas utilizadas.

Es conveniente recordar las normas básicas de trabajo en el laboratorio de Biología Molecular. Es fundamental la formación específica del personal técnico en este tipo de técnicas. Deberá utilizarse material dedicado exclusivamente para este efecto, guantes, pipetas, puntas con filtro y reactivos libres de nucleasas. En las técnicas de determinación de la carga viral, normalmente basadas en amplificaciones a tiempo real (con menor riesgo de contaminación), altamente automatizadas y con sistemas enzimáticos de prevención de la contaminación, ya no es necesaria una clara separación de áreas de trabajo. En técnicas menos desarrolladas, sin embargo, puede ser necesario contar con áreas separadas de procesamiento. Todos los sistemas deben contar con controles internos de extracción y amplificación para monitorizar el proceso completo, así como controles externos adecuados.

Para determinar la carga viral del VHB y del VHC se utilizan habitualmente sistemas automatizados que utilizan entre 200 y 700 mL de muestra. El volumen de muestra extraída suele ser directamente proporcional a la sensibilidad analítica. Los sistemas extraen el ácido nucleico viral y lo purifican, predispensan los reactivos necesarios para su amplificación, ejecutan la amplificación y detectan a tiempo real la señal fluorescente generada, comparándola con la de unos estándares de cuantificación conocidos. En el caso de la amplificación del ARN viral del VHC, dichos sistemas incorporan una reacción de transcripción inversa previa a la reacción de PCR.

Las principales aplicaciones de la determinación de la carga viral se dirigen a la demostración de la viremia, a la monitorización de la respuesta al tratamiento a la detección de la aparición de mutantes resistentes, y por último a la detección de recurrencias en los pacientes trasplantados.

Especialmente en la infección por el VHC y en referencia a los nuevos tratamientos, existen reglas de suspensión terapéutica basadas en los resultados de la carga viral a diferentes tiempos. Es fundamental que el laboratorio de microbiología sea ágil en la emisión de los resultados para evitar la aparición de resistencias y el consumo innecesario de estos fármacos especialmente costosos.

Para el genotipado de estos virus y la detección de mutaciones de resistencia se utilizan diferentes aproximaciones. Todas ellas comparten un proceso de lisis viral con extracción y purificación de los ácidos nucleicos y algún sistema de amplificación por PCR o RT-PCR. Algunos sistemas utilizan PCR a tiempo real con sondas específicas de diferentes dianas virales. Otros sistemas recurren a la PCR convencional seguida de hibridación inversa en tiras de celulosa. En este caso, el proceso de hibridación y revelado suele estar automatizado en equipos que dispensan los diferentes reactivos y realizan las incubaciones y lavados necesarios y las hibridaciones pueden ser analizadas *de visu* o con escáneres que proporcionan la lectura a un *software* de interpretación. Un tercer tipo de técnicas son las que proporcionan una secuenciación completa de fragmentos clave del ácido nucleico viral, utilizando para ello terminadores o primers marcados con fluorescencia. El grado de automatización de todas estas técnicas de genotipado es muy variable y deberán seguirse los procedimientos recomendados por los fabricantes de los distintos sistemas y las precauciones generales del laboratorio de Biología Molecular.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de carga viral del VHB y del VHC se expresan generalmente en Unidades Internacionales por mililitro de muestra (UI/mL). Cada técnica cuenta con un rango lineal definido fuera del cual no se expresarán resultados cuantificados discretos sino que se indicará que se está por debajo o por encima del rango de detección (por ejemplo, <15 UI/mL o >100.000.000 mL).

Los genotipos, caracterizados por PCR, hibridación o secuenciación, se expresarán de la forma más precisa posible (por ejemplo, en VHC, 1a ó 2a/2c si no es posible discriminar entre subtipos).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Marcadores moleculares de las hepatitis B y C	PNT-HV-2	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

Las mutaciones de resistencia a fármacos, detectadas por hibridación o secuenciación, se deben indicar e interpretar (por ejemplo, en VHB, “Mutación M240V, se detecta resistencia a lamivudina”).

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento analítico se llevará a cabo por personal técnico cualificado con formación específica. La coordinación y la supervisión de la técnica y de los resultados emitidos, su interpretación y su validación, se realizará por el facultativo especialista en Microbiología responsable del laboratorio. El equipo en pleno tendrá la responsabilidad de velar por ofrecer la máxima garantía de calidad en el proceso.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Los marcadores moleculares de detección y seguimiento de la infección por el VHB y el VHC, complementan a los marcadores serológicos y, salvo en alguna excepción, deben venir precedidos por ellos. En general, no debería solicitarse ni realizarse ninguna aproximación diagnóstica molecular sin contar con una buena caracterización serológica en las hepatitis virales.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Caliendo AM, Valsamakis A, Zhou Y, Yen-Lieberman B, Andersen J, Young S, et al. Multilaboratory comparison of hepatitis C virus viral load assays. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:1726-1732.
2. Schutzbank TE, Sefers SE, Kahmann N, Li H, Tang YW. Comparative evaluation of three commercially available methodologies for Hepatitis C virus genotyping. *J. Clin Microbiol.* 2006; 44:3797-3798.
3. Valsamakis A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20:426-439.